

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H. Herken

Untersuchungen über die Beteiligung der Prostaglandine an der Wundheilung und der Gewebsproliferation

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Richard Michael Ingerowski
Portland, Maine, U.S.A.

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0016

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H. Herken

Untersuchungen über die Beteiligung der Prostaglandine an der Wundheilung und der Gewebsproliferation

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Richard Michael Ingerowski

Portland, Maine, U.S.A.

Referent: Professor Dr. H. Herken

Korreferent: Professor Dr. H. Kewitz



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4.8.1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
1.1. Prostaglandine und Entzündung	4
1.1.1. Akute Entzündung	4
1.1.2. Chronische Entzündung	4
1.2. Prostaglandinbiosynthese	9
1.2.1. Nomenklatur und Struktur der Prostaglandine	9
1.2.2. Prostaglandinbiosynthese in vitro	9
1.2.3. Prostaglandinbiosynthese und -metabolismus in vivo	13
2. Allgemeine Methoden	14
2.1. Herstellung und Präparation des Granulationsgewebes	14
2.2. Nachweis der Prostaglandinsynthetase	16
2.2.1. Aufbereitung des Gewebes	16
2.2.1.1. Granulationsgewebe	16
2.2.1.1.1. Homogenate	16
2.2.1.1.2. Mikrosomen	16
2.2.1.2. Rindersamenblasen	17
2.2.1.3. Besondere Präparationsverfahren	17
2.2.1.4. Andere Gewebe	18
2.2.2. Ausführung der Prostaglandinsynthetase-Methode	18
2.2.2.1. Zubereitung des Substrats und der Kofaktorlösungen	19
2.2.2.1.1. Nicht-radioaktives Substrat	19
2.2.2.1.2. Radioaktives Substrat	19
2.2.2.1.3. Vorbereitung der Substratemulsion	20
2.2.2.1.4. Kofaktoren	21
2.2.2.1.5. Testsubstanzen	21
2.2.2.2. Inkubationsbedingungen und Extraktion	22
2.2.2.3. Dünnschichtchromatographie	22
2.3. Radioimmunoassay von Prostaglandinen	24
2.3.1. Theorie	24
2.3.2. Gewebeaufbereitung und Prostaglandin-isolierung	25
2.3.2.1. Vorbehandlung der Tiere	25
2.3.2.2. Gewebeaufbereitung	26
2.3.2.3. Isolierung der Prostaglandine	26
2.3.3. Ausführung der Bestimmung	28
2.3.3.1. Umsetzung in PGB	28
2.3.3.2. Bestimmungsansatz	28

	Seite
3. Ergebnisse	30
3.1. Bestimmung der Prostaglandinsynthetasekapazität und des Prostaglandingehaltes in Granulationsgewebe	30
3.1.1. Optimierung, Charakterisierung der Prostaglandinsynthetase-Methode mit Rindersamenblasenmikrosomen (RSBM)	30
3.1.2. Synthetase-Experimente mit Granulationsgewebe	36
3.1.2.1. Rohhomogenate von Granulationsgewebe	36
3.1.2.2. Mikrosomen aus Granulationsgewebe	38
3.1.3. Synthetase-Experimente mit anderen Geweben	39
3.1.4. Radioimmunoassay der Prostaglandine in Granulationsgewebe	41
3.2. Pharmakologische Untersuchungen mit Prostaglandinsynthetase hoher Aktivität	45
3.2.1. Lipopolysaccharid aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
3.2.2. Steroide	49
3.2.3. 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin und Pteridinderivate	50
3.2.3.1. Styrylpyrimidinwirkung in Rindersamenblasenmikrosomen	50
3.2.3.2. Untersuchungen auf anti-phlogistische Eigenschaften von Styrylpyrimidin (STAP)	56
3.2.3.3. Styrylpyrimidinwirkung auf die Prostaglandinsynthetase in Nierenmarkhomogenaten	60
4. Diskussion	66
5. Zusammenfassung	77
Literaturverzeichnis	80

Abkürzungen

PG	= Prostaglandin
cAMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
GSH	= reduziertes Glutathion
PGDH	= 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase
NADPH	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NAD	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat
RSBM	= Rindersamenblasenmikrosomen
STAP	= Styrylpyrimidin = 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin
LPS	= Lipopolysaccharid
cpm	= counts per minute = Zählimpulse pro Minute
SEM	= standard error of the mean = mittlerer Fehler des Mittelwerts

1. Einleitung

1.1. Prostaglandine und Entzündung

1.1.1. Akute Entzündung

Die Entdeckung von Vane und Mitarbeitern (1,2,3), daß die antiphlogistischen Pharmaka Acetylsalicylsäure und Indomethacin die Prostaglandinbiosynthese hemmen, war ein bedeutender Hinweis darauf, daß die Prostaglandine eine Funktion als einer von mehreren "mediators" (4) in der akuten Phase der Entzündung ausüben. Die folgenden Befunde unterstützten diese These: Prostaglandine in sehr geringen Mengen (ng- μ g) verursachen Hauterythem (5,6), Ödem (7,8), erhöhte Kapillarpermeabilität (9), Schmerz nach subkutaner Injektion (5,6) und Chemotaxis von Leukozyten (10). Prostaglandine sind in vergleichsweise hoher Konzentration (80 bis 100 ng/ml) in entzündlichen Exsudaten (11,12) nachzuweisen, deren variierende PG-Spiegel zeitlich mit dem entzündlichen Ablauf zu korrelieren sind (12,13). Schließlich ist bekannt, daß gewisse Pharmaka, die die PG-Synthese hemmen oder die Wirkung der Prostaglandine in vivo aufheben, auch die akute Entzündung unterdrücken (1,14-18).

1.1.2. Chronische Entzündung

Obwohl die Funktion der Prostaglandine als Mittlerstoffe bei der akuten Entzündung intensiv untersucht wurde, ist ihre Aufgabe in der chronischen Phase noch relativ unklar. Das klassische morphologische Substrat der unspezifischen, nicht immunologisch bedingten chronischen Entzündung ist das Granulationsgewebe, ein aktiv wachsendes Bindegewebe, das hauptsächlich aus Fibroblasten, Kapillarsprossen und mononuklearen Infiltraten (Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen) besteht (19,20).

Aus folgenden Gründen schien es sinnvoll anzunehmen, daß die Prostaglandine in der chronischen Entzündung eine Rolle spielen:

(a) Auch in der chronischen Phase der Wundheilung gibt es immer eine mehr oder weniger ausgeprägte exsudative Komponente (21), wie die Anwesenheit von Ödem und akut entzündlichen Zellen (polymorphkernige Leukozyten) beweist. Da die Prostaglandine, neben anderen Mittlerstoffen, in der Lage sind, solche exsudativen Erscheinungen zu verursachen, ist anzunehmen, daß eine endogene Produktion von Prostaglandinen vorliegt oder zumindest die Prostaglandine in physiologisch bedeutsamen Mengen in Granulationsgewebe vorhanden sind.

(b) Indomethacin und andere sogenannte "aspirin-like drugs" unterdrücken nicht nur die akute Phase der Entzündung (22), sondern vermindern auch die Menge an Granulationsgewebe, das von einer Wunde gebildet wird (23,24). Diese Substanzen hemmen gleichzeitig die PG-Biosynthese, so daß eine Funktion der Prostaglandine bei der chronischen Entzündung vermutet werden kann.

(c) Granulationsgewebe enthält anfänglich eine große Anzahl von polymorphkernigen Leukozyten, die allmählich im Laufe von Tagen bis Wochen durch Infiltrate von mononuklearen Zellen ersetzt werden (25). Es ist bekannt, daß Leukozyten und Makrophagen Phospholipase A enthalten und sie sogar freisetzen, wenn ungünstige metabolische Einflüsse einwirken (26,27). Dieses Enzym spaltet Arachidonsäure und andere Prostaglandinvorstufen aus den Phospholipiden der Zellmembran ab. (Diese Hydrolyse ist als geschwindigkeitsbestimmender Schritt (28,29) der Prostaglandinbiosynthese in vivo anzusehen.) Weiterhin haben Higgs und Youlton (30) die Synthese von PGE_1 in phagozytierenden Kaninchenleukozyten nachgewiesen. Auch werden Prostaglandine von Fibroblasten in der Zellkultur gebildet (31). Diese Aufreihung von Befunden unterstützt die Hypothese, daß Prostaglandine in einigen Zellen, die am chronischen Entzündungsablauf beteiligt sind, gebildet werden.

(d) Nach Injektion in die menschliche Haut verursachen die Prostaglandine eine mononukleare Zellinfiltration (32) und

einen Anstieg der Hyaluronsäurekonzentration (33). Arora et al. (7) fanden in künstlich induzierten subkutanen Granulomen, die mit 5 μg PGE_1 behandelt wurden, eine erhöhte Menge an Granulationsgewebe. Andere Arbeitsgruppen berichteten, daß PGE_1 und $\text{PGF}_{1\alpha}$ die Kollagenbiosynthese stimulieren, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen und erhöhte Hydroxylierung von ^{14}C -Prolin und ^{14}C -Lysin zeigten (34,35). Offenbar sind einige morphologische Erscheinungen der Wundheilung, nämlich Zellinfiltration und Kollagenbiosynthese, durch das Vorhandensein von Prostaglandinen begünstigt.

(e) Weiterhin sind die Prostaglandine als Wachstumsregulatoren diskutiert worden. Kischer (36) zeigte mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie, daß PGE_1 und PGB_1 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) die epidermale Proliferation und Keratinisierung in Kükenembryokulturen stimulierten. Viele schnell wachsende bösartige Tumoren bilden ebenfalls große Mengen an Prostaglandinen (31), und Hammarström et al. (37) fanden, daß die Polyomavirus-Transformation von Hamsterfibroblasten mit einer beträchtlichen Steigerung der PGE_2 -Produktion einhergeht. Whitfield et al. (38) machten die interessante Entdeckung, daß sowohl die DNS-Synthese als auch die Zellproliferation von Rattenthymozyten stark anstiegen, wenn diese mit relativ hohen Konzentrationen von PGE_1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt wurden. Diese Befunde veranlaßten die Autoren vorzuschlagen, daß die Prostaglandine als Wundhormone fungieren könnten, indem sie in der Wundheilung Immunzellen aktivieren (39). Auf der anderen Seite haben Johnson et al. (40) gezeigt, daß hohe Konzentrationen von PGE_1 (12-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Fibroblasten einen Anstieg an intrazellulärem cAMP über die Stimulierung der Adenylcyclase hervorrufen können, was zur Folge hat, daß das Fibroblastenwachstum gebremst wird. Diese Experimente deuteten darauf hin, daß die Prostaglandine in Fibroblastenkulturen als Wachstumsregulatoren fungieren.

Wenn man auf der einen Seite die soeben beschriebenen Phänomene betrachtet, und da andererseits aber keine veröffentlichten Daten über die Menge und Herkunft von Prostaglandinen in Granulationsgewebe vorhanden sind, erschien es sinnvoll,

Bestimmungen der Synthesekapazität und Konzentration von Prostaglandinen in Granulationsgewebe der Ratte durchzuführen. Falls diese Bestimmungen gelingen sollten, wäre Gegenstand des zweiten Teils der experimentellen Arbeit, die Wirkung von drei Substanzen, die die Entzündung und die Zellvermehrung beeinflussen und deren Wirkungsmechanismus möglicherweise über die Prostaglandine abläuft, auf die Prostaglandinsynthese und -konzentration in Granulationsgewebe in vivo und in vitro zu untersuchen.

Auf die Eigenschaften der zu prüfenden Substanzen und die Gründe für ihre Auswahl wird kurz eingegangen:

(a) Lipopolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa*

Es konnte gezeigt werden, daß Lipopolysaccharide (LPS) aus gramnegativen Bakterien die Proliferation von Granulationsgewebe stimulieren und die Syntheserate und -menge von Kollagen in experimentell erzeugten Wunden erhöhen (96,97,98). Außerdem verursachen bakterielle LPS Plättchenaggregation (99), Abort und Diarrhöe (100), Fieber (101) und Entzündung (102). Da all diese Effekte durch Prostaglandine hervorgerufen (7,16,34,35,101,103,104) und auch durch Prostaglandinsynthesehemmstoffe ausgeschaltet werden können (16,23,24,100,101,104,105), war es naheliegend, zu untersuchen, ob die LPS über das Prostaglandinsynthetase-System wirken.

(b) Steroide

Das Steroid Carbenoxolon (das Hemisuccinat der 18 β -Glycyrrhetinsäure) (115) und einige Derivate (150) besitzen eine heilende Wirkung sowohl auf Magenulcera als auch auf Ulcera anderer Schleimhäute (116). Es ist bekannt, daß die Prostaglandine ebenfalls einen schützenden, ulcusheilenden Effekt auf die Magenschleimhaut ausüben (117,118) (siehe Lit.(49) für konträre Angaben) und daß sie sowohl das Wachstum und die Differenzierung von epidermalen Geweben stimulieren (36) als auch die Kollagenbiosynthese anregen (35). Es stellte sich somit die Frage, ob der Wirkungsmechanismus dieser Gruppe von Steroiden über eine vermehrte Prostaglandinbildung im Gewebe abläuft.

Jedoch können weitere pharmakologische Wirkungen von Glycyrrhetinsäurederivaten nicht durch eine Stimulierung der Prostaglandinsynthese erklärt werden. Zum Beispiel weisen 18 β -Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon anti-entzündliche Eigenschaften bei der Cotton-Pellet-Granuloma-Methode auf, wobei sie ein Achtel bzw. eine Hälfte der Wirksamkeit des Hydrocortisons (bezogen auf Gewicht) zeigen (113,114). Weiterhin wirkt Carbenoxolon antikoagulierend (114). Andererseits ist erwiesen, daß Prostaglandine sowohl am Entzündungsablauf als auch an der Plättchenaggregation beteiligt sind (105). Daraus läßt sich ableiten, daß die ulcusheilenden Steroide möglicherweise einen hemmenden Effekt auf die Prostaglandinsynthetase haben. Diese sich widersprechenden Befunde veranlaßten mich, den Einfluß der triterpenoiden Steroide im Vergleich zu anderen Steroiden auf die Prostaglandinbiosynthese zu prüfen.

(c) 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin und Pteridinderivate
2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin (STAP, Styrylpyrimidin) und einige Pteridine rufen in Versuchstieren regenerative Nierenvergrößerung nach parenteraler Applikation hervor. Diese Verbindungen verursachen eine Erhöhung sowohl des Trocken- und Feuchtgewichts als auch des DNS-, RNS-, Protein- und Fettgehaltes des Nierengewebes und eine höhere Mitoserate in den Nierentubuli (120-124). Eine plausible Erklärung für die Zellvermehrung in der Niere ist möglicherweise durch die Versuchsergebnisse von Sheppard et al. (127,128) zu finden, der zeigte, daß die Prostaglandine über die Aktivierung der Adenylcyclase und die damit verbundene Erhöhung der cyclischen Nukleotide einen wachstumshemmenden Einfluß ausüben können. Daraus ließe sich ableiten, daß bei einer erniedrigten Prostaglandinsynthese die intrazelluläre cAMP-Konzentration fallen und demzufolge die Zellteilungsrate erhöht würde.

Es soll geprüft werden, ob 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin und einige Pteridinderivate über einen ähnlichen Mechanismus die Zellvermehrung in der Niere stimulieren.

1.2. Prostaglandinbiosynthese

Bevor mit dem experimentellen Teil der Arbeit begonnen wird, soll noch kurz auf einige Aspekte der Prostaglandinsynthese eingegangen werden, um die Interpretation der folgenden Versuche zu erleichtern.

1.2.1. Nomenklatur und Struktur der Prostaglandine

Prostaglandine sind C-20 Hydroxyfettsäuren, die aus vielfach ungesättigten Fettsäuren wie Linolen- und Arachidonsäure entstanden sind. Diese Fettsäureabkömmlinge sind offenbar an zahlreichen physiologischen Abläufen in einer Vielzahl von Spezies beteiligt (41-45). Die Prostaglandine werden in sechs Gruppen unterteilt, jede davon wird durch die Buchstaben E, F, A, B, C oder D entsprechend der Struktur des Cyclopentanringes (Abb. 1) gekennzeichnet. Die Ziffern 1, 2 oder 3 beziehen sich auf die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten, während die Bezeichnung α oder β , wie z.B. $\text{PGF}_{2\alpha}$, die Position der beiden Hydroxylgruppen am Cyclopentanring festlegt. Die Anzahl der Doppelbindungen in der Seitenkette beträgt immer zwei weniger als die Zahl in der Fettsäure, aus der das Prostaglandin entsteht. PGE_1 , PGE_2 und PGE_3 sind dementsprechend von C-20 Fettsäuren abgeleitet, die 3, 4 und 5 isolierte Doppelbindungen aufweisen.

Abbildung 1 stellt einige Formeln von den wichtigeren Prostaglandinen zusammen mit ihren Vorläufern dar. PGE_3 und $\text{PGF}_{3\alpha}$ werden selten in der Natur gefunden (42). Die Prostaglandine PGD, PGC (nicht abgebildet) und zahlreiche Prostaglandinmetaboliten sind beschrieben worden, jedoch ist wenig über ihre physiologische Bedeutung bekannt (43,46).

1.2.2. Prostaglandinbiosynthese in vitro

Die Prostaglandinsynthese aus essentiellen Fettsäuren (47,48,49) ist in in vitro Experimenten in fast allen Arten von menschlichen und tierischen Geweben, die sich erheblich in ihrer Synthesekapazität unterscheiden, nachgewiesen worden (50). Durch

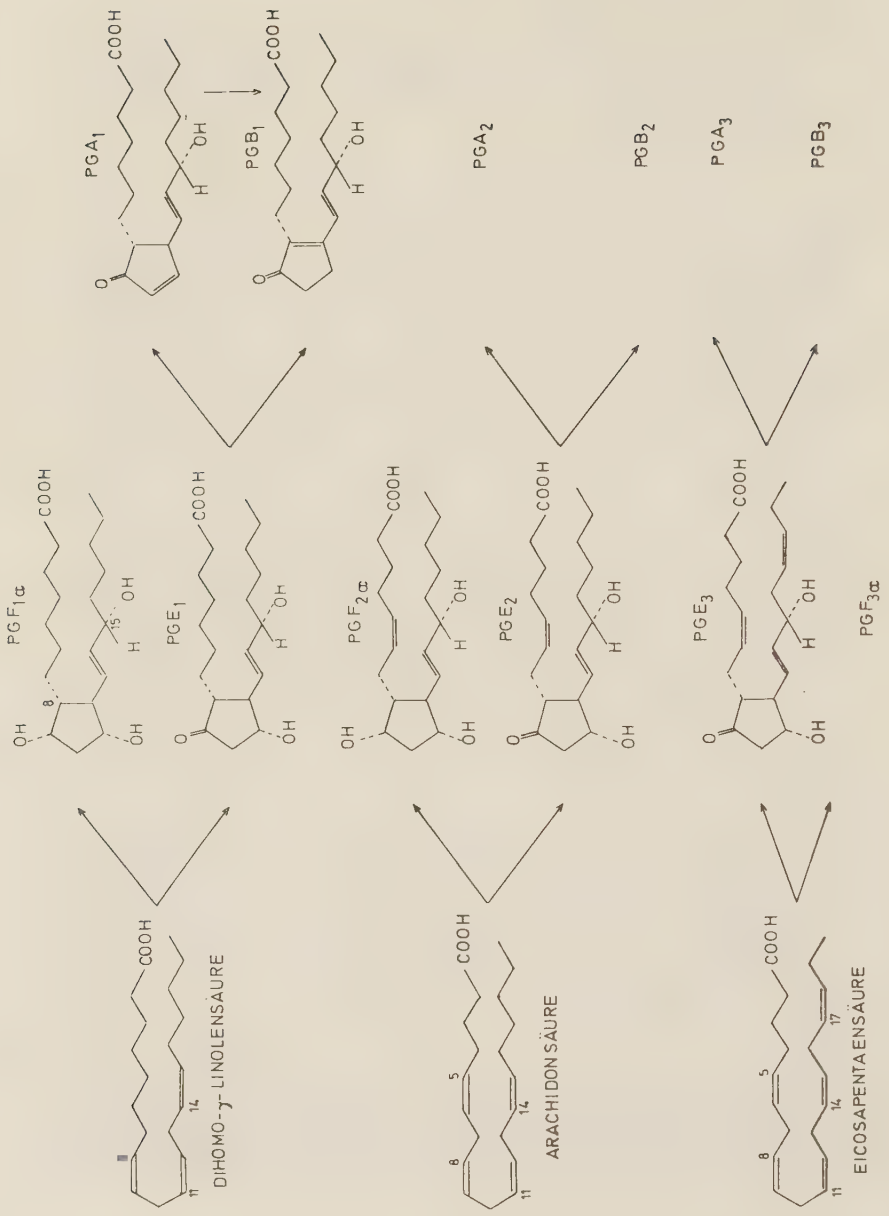


Abbildung 1: Struktur und Nomenklatur von einigen Prostaglandinen mit Vorläufern.

fraktionierte Zentrifugation von Gewebehomogenaten wurde festgestellt, daß das Prostaglandinsynthese-System sich in der Mikrosomenfraktion der Schafsamenblasen (48,51), Rindersamenblasen (52), Fettgewebe (53) und Haut (54) befindet. Die enzymatische Umwandlung von Substrat in Prostaglandine durch die Synthetase in Abhängigkeit von der Zeit ist nur während der ersten paar Minuten konstant (49,55-58). Die Reaktion erreicht selbst unter optimalen Bedingungen ein Plateau, bevor das Substrat vollständig umgesetzt wird. Durch Zufügen von mehr Enzym kann nur ein ebenfalls begrenzter Anstieg in der Synthese von Prostaglandin erreicht werden (56). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich durch die Enzymhemmung von Fettsäurereaktionsprodukten zu erklären (55,56). Um die Probleme der unterschiedlichen Kinetik und der Enzyminhibition zu vereinfachen, hat van Dorp (59) vorgeschlagen, daß die Prostaglandinsyntheseaktivität von verschiedenen Geweben als Prozent der Umwandlung der zugefügten Vorstufe pro Gewichtseinheit Gewebe ausgedrückt wird.

Die optimalen Syntheseausbeuten von allen bisher untersuchten Geweben lassen sich in etwa drei Kategorien einteilen (50):

- (a) Gewebe mit hoher Synthesekapazität (>10%), wie z.B. Schaf- und Rindersamenblasen (60-80%) und Kaninchennierenmark (45%);
- (b) Gewebe mit mittlerer Kapazität (ca. 3%); Dünndarm des Schafes (5%) und des Kaninchens (3%) und
- (c) Gewebe mit geringerer Kapazität, die in der Mehrzahl sind, z.B. Knochenmark des Meerschweinchens (1%) und Nierenrinde vom Schwein (<1%).

Wegen der Schwierigkeit, die außerordentlich kleinen Mengen von Prostaglandin zu bestimmen, die von Geweben mit geringerer Synthesekapazität produziert werden (53,59,60), werden in den meisten kinetischen Untersuchungen die Prostaglandinsynthetasen hoch aktiver Systeme angewendet, wie z.B. aus Rinder- (49,52) und Schafsamenblasenmikrosomen (47,48). Das Synthetasesystem aus Schafsamenblasen verwandelt sowohl Dihomo- γ -linolensäure (8c,11c,14c-Eicosatriensäure, 20:3)

als auch Arachidonsäure (5c,8c,11c,14c-Eicosatetraensäure, 20:4) in PGE_1 bzw. PGE_2 in 60-80%igen Ausbeuten unter optimalen Bedingungen. Die cis-Eicosapentaensäure (20:5), die Vorstufe des PGE_3 , wird in diesem System in geringerem Ausmaß umgesetzt (5-8%) (44,56). Für das Rinder- und Schafsaamenblasensystem sind optimale Syntheseraten bei einem pH von 8 bis 9 zu erreichen, wobei der verwendete Puffer und die Anwesenheit von phenolischen Kofaktoren gleichzeitig Einflußgrößen darstellen (49,56,58).

Die Biosynthese der Prostaglandine in vitro aus den Säurevorstufen kann durch zugefügtes reduziertes Glutathion gesteigert werden, jedoch nicht durch diverse Thiole oder NADPH (51,61). Ohne GSH ist die PGE_2 -Produktion kaum nachweisbar (56). GSH verschiebt die Synthese von PGF und Hydroxyfettsäuren zugunsten von PGE (62), außerdem wird die Gesamtausbeute an Prostaglandin durch einen bisher ungeklärten Mechanismus (63) erhöht. Samuelsson berichtete (51), daß Tetrahydrofolsäure und 6,7-Dimethyltetrahydrobiopterin das GSH ersetzen können, um die Ausbeute sowohl an PGF als auch PGE in Schafsaamenblasenhomogenaten zu erhöhen. Jedoch konnte Takeguchi (49) für diese Pteridine keine solche Kofaktorstärke in Rindersaamenblasenpräparaten feststellen. Andererseits kann die PGF-Produktion durch Cu^{++} -Dithiol-Komplexe begünstigt werden (64).

In Gegenwart von GSH kann die Gesamtausbeute von Prostaglandinen sogar weiter gesteigert werden, wenn Hydroxybenzolderivate wie Hydrochinon und Propylgallat dem Medium zugefügt werden (62,65). Eine Anzahl von ähnlichen Substanzen kann ebenfalls als Kofaktor dienen, so z.B. L-Adrenalin, 5-Hydroxyindolessigsäure und Serotonin (49). Experimente von Smith et al. (66) zeigen, daß diese Substanzen zeitabhängig das Prostaglandinsynthese-System aktivieren und daß die antiphlogistischen Verbindungen diese Aktivierung irreversibel hemmen. Weiterhin ist bekannt, daß viele dieser Kofaktoren, in 10-fach höheren als optimalen Konzentrationen, einen hemmenden Effekt haben (56). Bisher bleibt jedoch ungeklärt, ob die erwähnten Kofaktoren tatsächlich eine phy-

siologische Rolle in der Prostaglandinsynthese in vivo spielen, und inwieweit sie (oder andere in der Natur vorkommende Kofaktoren) die Menge und die Art (PGA - F) der in vivo produzierten Prostaglandine bestimmen.

1.2.3. Prostaglandinbiosynthese und -metabolismus in vivo

Prostaglandine werden in kleinsten Mengen (10^{-9} - 10^{-7} mol/g Gewebe) von fast allen bisher untersuchten Geweben durch neural, mechanisch oder hormonell bedingte Einflüsse freigesetzt (44,67,68). Es gibt keine Depotform der Prostaglandine als solche (69), sondern sie werden in situ aus den unveresterten Fettsäurevorstufen rasch synthetisiert (47,48). Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Prostaglandinsynthetase um einige Größenordnungen höher liegt als die der Substratfreisetzung durch Phospholipase A, ist die letzte Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (12,70,71). Das heißt, die Produktion von Prostaglandinen in vivo ist abhängig von der Konzentration der freien Fettsäuren und damit von der Aktivität der Phospholipase A.

Die Art der als Phospholipid gebundenen essentiellen Fettsäure, die in einem Organ oder Gewebe überwiegt, legt den Sättigungsgrad des resultierenden Prostaglandins fest. Fettgewebe der Ratte (53), z.B., und Kaninchennierenmark (73), die einen hohen Gehalt an veresterter Arachidonsäure aufweisen, setzen vorwiegend PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ frei (53,74). In Schafsamenblasen und Nebennieren stellen andererseits Dihomo- γ -linolensäure und $\text{PGE}_1/\text{F}_{1\alpha}$ die hauptsächlichen Vorstufen bzw. Syntheseprodukte dar (71,75,76). Zusätzliche regulierende und geschwindigkeitsbestimmende Faktoren sind ebenfalls in vivo postuliert worden, beispielsweise die Aktivierung der Prostaglandinsynthetase durch Kofaktoren (66) oder das bemerkenswerte Phänomen der Enzymselfstzerstörung durch Fettsäurenebenprodukte bei der Synthese (55). Die Bedeutung der Prostaglandin-Isomerasen, die in der Lage sind, einen Prostaglandintyp in einen anderen umzuwandeln (46,77), ist immer noch weitgehend unbekannt.

Die Konzentration an Prostaglandin in einem Gewebe zu einer gewissen Zeit ist ebenfalls von der Inaktivierungsgeschwindigkeit abhängig. Bis jetzt sind zwei prostaglandinabbauende Enzyme entdeckt und charakterisiert worden, nämlich 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase (PGDH) (78) und Prostaglandin-13-reduktase (79). PGDH oxidiert die Hydroxylgruppe in der 15-Position zu einem Keton, wobei NAD als Kofaktor dient. Dadurch wird die biologische Aktivität des Prostaglandins reduziert (70). Das Enzym ist sehr spezifisch für PGE_1 und PGE_2 und weit weniger spezifisch für PGE_3 und alle PGF, -A und -B Verbindungen. Durch Prostaglandin-13-reduktase wird die 13-Doppelbindung gesättigt (79), die in allen Prostaglandinen vorhanden ist. Dieses Enzym erfordert die Anwesenheit einer Carbonylgruppe an C-15; weitere Erkenntnisse über seine Spezifität und subzelluläre Lokalisation fehlen zur Zeit noch. Entweder eines oder beide dieser Enzyme sind in der Nierenrinde und der Darmwand von Schafen und Meerschweinchen und in der Lunge von Schweinen, Schafen, Ratten und Menschen gefunden worden (80,81). Gewisse Gewebe jedoch, wie z.B. Kaninchennierenmark, scheinen keine prostaglandinabbauenden Enzyme zu enthalten (74,82). Außerdem tritt β - und ω -Oxidation auf, wie mit Lebermikrosomenfraktionen von mehreren Spezies gezeigt werden konnte (83).

2. Allgemeine Methoden

2.1. Herstellung und Präparation des Granulationsgewebes

Für ein Screening-Verfahren zur Erfassung von anti-entzündlichen Pharmaka wurde von Rudas et al. (23) eine Methode für die Präparation von Granulationsgewebe beschrieben. Diese Methode mit einer offen gehaltenen Wunde wurde in einer modifizierten Form in den folgenden Experimenten angewandt, um Gramm-Mengen von histologisch reinem Granulationsgewebe zu erhalten.

Dazu werden bei männlichen Ratten mit vergleichbaren Körper-

gewichten die Rückenhaare abrasiert, nachdem sie leicht mit Äther betäubt worden sind. Es wird ein etwa 2 cm langer Einschnitt parallel zur Mittellinie durch die Haut vorgenommen. Sodann wird die Haut ca. 1 cm auf allen Seiten mit einer Schere abpräpariert, wobei beachtet werden muß, daß die darunter liegende Fascia-Schicht unverletzt bleibt. Ein Aluminiumring (2 cm innerer Durchmesser, 1 cm hoch), der zuvor mit Zaponlack versiegelt wurde, um eine korrosionsbedingte Verunreinigung der Wunde zu vermeiden, wird in der Weise in die Wunde eingelegt, daß die Hautränder fest in der äußeren Kerbe des Ringrandes anhaften. Um zu verhindern, daß der Ring spontan von der Wunde ausgestoßen wird, was in der Regel bei Wunden passiert, die älter als 5 Tage sind, wird eine Michelklemme an jedem Ende des Einschnitts angebracht. Diese Maßnahme bewirkt, daß die Wundränder den Ring fester umschließen.

Die exponierte Fascia in dem Ring wird innerhalb von 12 bis 24 Stunden mit einem feuchten, gelb-grauen Exsudat bedeckt, das danach schnell eintrocknet und dunkler wird. Nach einem Zeitraum zwischen 3-7 Tagen kann das Granulationsgewebe für in vitro Experimente isoliert werden. Die Ratten werden durch Dekapitation und darauf folgende Ausblutung getötet. Die Haut wird an der Seite der Wundstelle eingeschnitten und mit dem unversehrten Granulationsgewebe vorsichtig mit einer Schere von der darunter liegenden Fascia abgelöst. Nach dem Ausbreiten des Hautausschnittes auf einer Polyäthylenplatte wird der Ring entfernt, und die überhängenden Hautränder werden aufgeschnitten, um das Granulationsgewebe freizulegen. Ein am unteren Rand geschärftes Stahlrohr (1,7 cm innerer Durchmesser) wird benutzt, um ein einheitliches, rundes Stück des Granulationsgewebes auszustanzten. Das Gewebe wird gewogen und dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, so daß ein durch Synthese bedingter postmortaler Anstieg an Prostaglandin vermieden wird. Ist eine unmittelbare Weiterbearbeitung des Gewebes vorgesehen, dann werden die zerkleinerten Gewebestückchen in Puffer homogenisiert (Teil 2.2.1.1.1.).

Je nach Alter des Gewebes und des Körpergewichts des Tieres können Gewebestückchen erhalten werden, die zwischen 300 mg

und 1000 mg wiegen. Nach einiger Übung kann der Zeitraum, der von der Tötung des Tieres bis zum fertig präparierten Granulationsgewebe verstreicht, auf etwa eine Minute reduziert werden.

2.2. Nachweis der Prostaglandinsynthetase

Als Grundlage für den Nachweis der Prostaglandinsynthetase dienen die Arbeiten von van Dorp (48), Bergström (47) und anderen (49,56,84,85,87).

2.2.1. Aufbereitung des Gewebes

Alle Gewebe werden in einem 0,2M Tris-HCl Puffer (pH = 8,5) suspendiert und homogenisiert, der 1 mM GSH (62) und 0,07 mM EDTA (54,57) zur Stabilisierung des Enzyms enthält.

2.2.1.1. Granulationsgewebe

2.2.1.1.1. Homogenate

Das Granulationsgewebe von 10-20 Ratten wird in der Regel am Tag 3, 5 oder 7 nach der Ringeinsetzung isoliert. 7-10 g des zerkleinerten Gewebes werden in 20 ml Tris-HCl Puffer (pH = 8,5) aufgenommen und 30 Sekunden mit dem Ultraturrax mit voller Geschwindigkeit homogenisiert. Das Rohhomogenat wird durch eine Doppelschicht von Gaze filtriert, um grobe Bindegewebsbestandteile abzutrennen. Das Filtrat wird erneut mit dem Ultraturrax 30 Sekunden homogenisiert¹⁾, bis ein grau-brauner Brei entsteht, der dann ausreichend homogenisiert ist und exakt pipettiert werden kann. Aliquote Teile dieser Suspension werden für die Proteinbestimmung (86) abgenommen.

2.2.1.1.2. Mikrosomen

Das Homogenat des Granulationsgewebes wird in der Kälte 10 Minuten lang bei 7000 g zentrifugiert, um schwerere Zell-

1) Das Potter-Verfahren erwies sich wegen der großen Menge an schwer zerteilbaren Bindegewebsfasern als nicht anwendbar.

und Bindegewebsbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wird durch eine Gazeschicht filtriert, so daß Fettpartikel zurückbleiben. Das Filtrat wird bei 4 °C und 100.000 g eine Stunde lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und der Rückstand wird in Puffer aufgenommen. Es wird erneut bei 100.000 g zentrifugiert. Das Gewicht des resultierenden Rückstands wird festgestellt. Dann wird der Rückstand (als Mikrosomen bezeichnet) sofort in 1-2 ml Tris-HCl Puffer aufgenommen und bei -20 °C für spätere Experimente aufbewahrt.

2.2.1.2. Rindersamenblasen

Um die Wirkung von verschiedenen Substanzen auf das Prostaglandinsynthetase-System exakt zu messen, werden Mikrosomenpräparationen von Rindersamenblasen bereitet, die Prostaglandine aus Arachidonsäure in hohen Ausbeuten liefern (85). Die Organe wurden direkt von einem Schlachthof bezogen, unmittelbar nach der Schlachtung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C bis zum Gebrauch etwa eine Woche später aufbewahrt. Etwa 100-200 g des angetauten Gewebes werden in kleine Stücke geschnitten oder in einem vorgekühlten Fleischwolf zerkleinert, nachdem anhaftendes Fett und Bindegewebe zuvor abgetrennt worden sind. Das Gewebe wird in dem zweifachen Volumen Tris-HCl Puffer aufgenommen. Die Isolierung der Mikrosomen wird wie in Teil 2.2.1.1.2. beschrieben vorgenommen. Die Proteinkonzentration in der Mikrosomensuspension wird ebenfalls bestimmt.

2.2.1.3. Besondere Präparationsverfahren

Tan und Privett (60) zeigten, daß viel größere Ausbeuten an Prostaglandinen aus ihren Vorstufen erreicht werden können, wenn Rattensamenblasen in flüssigem Stickstoff zerkleinert wurden anstelle einer wäßrigen Homogenisierung. Diesen Befund führten sie auf eine Verminderung der spontanen Enzymzerstörung zurück, die normalerweise während der wäßrigen Behandlung auftritt. In mehreren Experimenten wurde Granulationsgewebe nach einer Modifikation dieser Methode aufbereitet. Danach

werden insgesamt 15 g Granulationsgewebe isoliert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Mörsers wird dieses extrem harte Gewebe zu einem feinen Pulver zerrieben. Es folgt die Aufnahme im doppelten Volumen Puffer und die Entnahme eines Aliquots für die Proteinbestimmung. Diese Suspension von Granulationsgewebe wird dann direkt für die Prostaglandinsynthetasekapazitäts-Messung eingesetzt, wie in Teil 2.2.2.2. beschrieben wird. Andere Gewebe, die erwartungsgemäß niedrige Prostaglandinsynthetase-Aktivität aufweisen, werden ebenfalls in dieser Weise aufbereitet.

Rattennierenmedulla wurde auch in der Regel nach diesem Verfahren aufbereitet. Dazu werden die Nieren den frisch getöteten Tieren entnommen und jeweils an dem Hilus in der Längsachse halbiert. Der innere Anteil des Nierenmarks (Nierenpapille) wird mit einer Schere herausgeschnitten und sofort in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Das Enzym kann mindestens eine Woche ohne nennenswerten Verlust an Aktivität in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der Prostaglandinsynthesebestimmung werden die Homogenate so verdünnt, daß eine einheitliche Proteinkonzentration in allen Proben vorliegt.

2.2.1.4. Andere Gewebe

Einige andere Rattengewebe werden auf ihre prostaglandinsynthetisierende Kapazität untersucht, um die Ausbeute an Prostaglandin von Rattengranulationsgewebe mit der von anderen Geweben derselben Spezies zu vergleichen. Folgende Gewebe wurden geprüft: Haut (Dermis und Epidermis), Nierenrinde, Nierenmedulla, Samenblasen und Magenschleimhaut.

2.2.2. Ausführung der Prostaglandinsynthetase-Methode

Die enzymatische Umsetzung von Arachidonsäure in Prostaglandin wird in einem Schüttelbad durchgeführt. Dabei werden Schliffreagenzgläser mit folgendem Inhalt eine Stunde bei 37 °C inkubiert:

Substrat: Arachidonsäure, Endkonzentration 0,33 mM;
¹⁴C-Arachidonsäure, ca. 100.000-200.000 cpm;
Kofaktoren: Reduziertes Glutathion 3 mM;
L-Adrenalin 0,5 mM; EDTA 0,07 mM;
Enzymsuspension: 0,5-1,0 ml;
Puffer: Tris-HCl, pH = 8,5; 0,2 mM;
Gesamtvolumen: 3,0 ml.

Sowohl die optimalen Substrat- und Kofaktorkonzentrationen als auch der pH und die Zusammensetzung des Puffers wurden der Originalliteratur entnommen (49,56,58,84,85,87).

2.2.2.1. Zubereitung des Substrats und der Kofaktorlösungen

2.2.2.1.1. Nicht-radioaktives Substrat

Arachidonsäure (Sigma Chem. Co.), 99% rein, wird in einem Exsikkator unter Stickstoff im Dunklen bei -20 °C gelagert. Es sollte beachtet werden, daß die Substanz so kurz wie möglich Licht- und Sauerstoffeinfluß ausgesetzt wird, um Oxidationen zu vermeiden. Die Säure wird wiederholt auf Zersetzungsprodukte untersucht mit Hilfe des Dünnschichtchromatographie-Systems "A", wie es in Teil 2.2.2.3. erläutert ist. Bei den beschriebenen Lagerbedingungen werden bis zu 6 Monaten keine weiteren Flecke außer dem der Arachidonsäure sichtbar, wenn die DC-Platte nach der Chromatographie Joddämpfen ausgesetzt wird.

Eine Stammlösung von Arachidonsäure wird hergestellt, indem man etwa 50-100 µl der Säure in einen Kolben gibt, die Menge auswägt und dann ein genau berechnetes Volumen an Benzol p.a. hinzufügt, so daß eine Konzentration von 3,01 mg Säure/ml Benzol resultiert. 100 µl dieser Stammlösung entsprechen dann 0,301 mg Arachidonsäure, der Menge, die in einem Synthetase-Ansatz von 3,0 ml vorhanden sein muß, um eine 0,33 mM Lösung zu ergeben.

2.2.2.1.2. Radioaktives Substrat

[1- ¹⁴C]-Arachidonsäure (54 mCi/mmol) (Amersham) wird in Mengen zu 10-50 µCi in benzolischer Lösung gekauft und so

gelagert wie die nicht-markierte Säure (Teil 2.2.2.1.1.). Eine benzolische Stammlösung (ca. 50.000 cpm/100 μ l) wird hergestellt, indem 10 μ Ci des Isotops mit 50 ml Benzol p.a. verdünnt werden. Wiederholte Dünnschichtchromatographie der Säure im Laufmittelsystem "A" zeigte, daß mit der Zeit erhebliche Zersetzung der markierten Verbindung auftrat (bis zu 35% nach 6-monatiger Lagerung). Die Abbauprodukte waren im Rf-Bereich von 0,42-0,67 nachweisbar. In diesen Fällen wird mit ca. 5 μ Ci der Säure eine Chromatographie durchgeführt, wie sie in Teil 2.2.2.3. beschrieben ist. Die Arachidonsäure wird mit Hilfe eines DC-Scanners lokalisiert (Rf-Bereich = 0,87). In diesem Rf-Bereich wird das Kieselgel von der Platte abgeschabt, und die gereinigte Säure wird mit Benzol eluiert. Die radioaktive Lösung wird auf die gewünschte Aktivität eingestellt (ca. 50.000 cpm/100 μ l).

2.2.2.1.3. Vorbereitung der Substratemulsion

Markiertes und nicht-markiertes Substrat werden zu jedem Ansatz in Form einer 0,5 ml Pufferemulsion zugegeben, die unmittelbar vor jedem Experiment folgenderweise zubereitet wird. Eine entsprechende Menge der nicht-radioaktiven Arachidonsäurestammlösung (0,1 ml/Ansatz) wird in einen 30 ml-Glasbehälter pipettiert. Dazu wird eine berechnete Menge an radioaktiver Arachidonsäurestammlösung (100.000-200.000 cpm/Ansatz) gegeben. Nachdem alle Spuren des Lösungsmittels unter einem Stickstoffstrom in einem Wasserbad bei 40 °C abgeblasen worden sind, wird so viel Tris-HCl Puffer in das Glas gegeben, daß sich ein Volumen von 0,5 ml pro Ansatz ergibt. Das Reagenzglas wird verschlossen, und die Lösung wird vorsichtig umgeschüttelt, um die an den Wänden anhaftende Arachidonsäure abzulösen. Anschließend wird die Lösung in einem Schüttelbad bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert. Es resultiert eine milchige Suspension, die 30 Sekunden lang ultraschallt wird, umgeschüttelt und wiederum 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt wird. Diese Substratemulsion wird in jedem Experiment im System "A" dünnschichtchromatographiert. Die gesamte Radioaktivität befindet sich in dem Rf-Bereich

der reinen Arachidonsäure, was bedeutet, daß keine bemerkenswerte Zersetzung während dieser Behandlung stattgefunden hat.

2.2.2.1.4. Kofaktoren

Stammlösungen von reduziertem Glutathion (Boehringer-Mannheim) und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Äthylendiamintetraacetat, p.a.) werden in Tris-HCl Puffer hergestellt. L-Adrenalin (Sigma) wird in einer entsprechenden Menge Wasser gelöst, das mit einigen Tropfen 0,1n HCl angesäuert wird. Ein Aliquot von 50 μl der L-Adrenalin-Stammlösung in 3,0 ml Tris-HCl Puffer (pH = 8,5) ändert den pH dieser Lösung nicht nennenswert. Alle Lösungen werden für jedes Experiment frisch zubereitet.

2.2.2.1.5. Testsubstanzen

Die Testsubstanzen werden für jeden Versuch in den entsprechenden Mengen eines der Lösungsmittel Äthanol p.a., 2%ige Natriumcarbonatlösung oder Wasser gelöst.

Äthanollöslich: Indomethacin (Sharp und Dohme, München), Acetylsalicylsäure p.a. (Merck), 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin, Pyrimethamin (Burroughs Wellcome) (in warmem Äthanol lösen und aliquoten Anteil zu temperiertem Puffer, 37 °C, hinzufügen), Trimethoprim (Burroughs Wellcome; zu lösen wie Pyrimethamin), Triamteren (schwer in warmem Äthanol löslich), 2-Styrylpyridin, 18 β -Glycyrrhetinsäure purum (Roth), Cortison (Merck), 2-Hydroxydodecansäure, Decan-, Laurin-, Myristin-, Palmitin- und cis-Vaccensäure (alle Fettsäuren Nu-Chek-Prep, USA).

In wäßrigem 2%igem Natriumcarbonat löslich: Folsäure (Merck), Methotrexat (Lederle), 2-Amino-4-hydroxypteridin, Xanthopterin (EGA-Chemie).

Wasserlöslich: Prednisolonehemisuccinat (Merck), Aldosteron (Ciba), Carbenoxolon (Dinatriumsalz der 3-O-(β -Carboxypropionyl)-11-oxo-18 β -olean-12-en-30-ansäure (Biorex Laboratories, London) und Pseudomonas heptavalentes Antigen (eine Mischung von je 0,12 mg/ml LPS von sieben häufig vorkommenden Immunotypen von Pseudomonas aeruginosa) (Parke-Davis).

2.2.2.2. Inkubationsbedingungen und Extraktion

0,5-1,5 ml der Enzymsuspension, die zuvor entsprechend mit Tris-HCl Puffer verdünnt wurde, um die gewünschte Proteinkonzentration zu erhalten, werden in Schliffgläser pipetiert, die in einem Eisbad aufbewahrt werden. Nachdem die Kofaktoren L-Adrenalin, GSH und EDTA als Stammlösungen hinzugefügt worden sind, wird der Ansatz mit Tris-HCl Puffer auf ein Volumen von 2,4 ml aufgefüllt. Die Gläser werden in ein warmes Wasserbad (37°C) gestellt und 5-10 Minuten aufgewärmt. Anschließend werden die Testsubstanzen in 100 μl Lösung zu dem Ansatz gegeben, der dann 10 Minuten lang präinkubiert wird, um die maximale Enzymaktivierung durch die Kofaktoren zu ermöglichen (66). Äthanol- und Natriumcarbonatkontrollwerte werden ebenfalls angesetzt, wo es angezeigt ist, während auf 100°C erhitztes Enzym als Kontrollwert dient, wenn Gewebe oder Mikrosomen mit geringer Syntheseaktivität eingesetzt werden, um unspezifische Substratumwandlung in Prostaglandin auszuschließen (88). Die Reaktion beginnt abzulaufen, nachdem 0,5 ml der Substratemulsion (Teil 2.2.2.1.3.) hinzugefügt worden ist. Die Inkubation wird in einem Schüttelbad bei 37°C 60 Minuten in verschlossenen Schliffgläsern ausgeführt, welche in Abständen von etwa 5 Minuten kräftig geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung mit atmosphärischem Sauerstoff zu gewährleisten. Die Reaktion wird beendet, indem 3,0 ml kalte 1,0 n Citronensäurelösung zugegeben werden. Die angesäuerte Suspension ($\text{pH} = 2,0$) wird dreimal mit 5,0 ml Diäthyläther extrahiert, und die vereinigten Ätherextrakte werden in einem Stickstoffstrom bei 30°C eingeengt. Vor der Chromatographie wird der gelb-braune Rückstand in 100 μl Benzol und 100 μl Äthanol aufgelöst.

2.2.2.3. Dünnschichtchromatographie

Kieselgel DC-Fertigplatten (Aluminiumfolien, 20 x 20 cm, 0,25 mm Schichtdicke, Merck) werden vor Gebrauch eine Stunde bei 100°C im Trockenschrank aktiviert. Mit Hilfe einer Mikrospritze werden 10-15 μl des gelösten Rückstandes auf

die Platte in Form eines 1,5 cm langen, dünnen Streifens, der 1-2 cm vom unteren Rand entfernt ist, aufgetragen. Sechs bis sieben Ansätze können auf eine Platte aufgebracht werden. In allen Experimenten werden ebenfalls 5 µl der Substratemulsion chromatographiert, um die Laufstrecke der Arachidonsäure zu kennzeichnen und mögliche Zersetzungsprodukte des Substrats festzustellen. Das Laufmittelsystem "A" (89), das in den meisten Experimenten angewandt wird, besteht aus: Diäthyläther + Petroläther (60-80 °C Sdp.) + Eisessig + Methanol = 50 + 40 + 5 + 5 (v/v). Die Laufstrecke beträgt ca. 11 cm. Nach der Chromatographie werden die getrockneten Platten Joddämpfen ausgesetzt, die die Substanzflecken innerhalb von 5 Minuten gelb-braun färben. Anschließend werden die Platten sofort photokopiert, um die Verteilung der Flecken zu dokumentieren.

Die korrekte Identifizierung der Prostaglandine in den chromatographierten Extrakten wurde durch folgende Experimente erhärtet:

(a) Reines PGE_2 und die "Prostaglandine" des Extraktes zeigen die gleichen R_f -Werte, die zwischen 0,11 und 0,20 liegen (Durchschnitt 0,17). Diese Werte stimmen gut mit denen von Horton et al. (89) überein, 0,13-0,30. .

(b) Wird ^{14}C -Arachidonsäure mit Stiersamenblasenmikrosomen inkubiert, ergeben sich ätherische Extrakte, deren radioaktive Peaks nach Chromatographie im System "A" die gleichen R_f -Werte im DC-Scanner aufweisen wie die von PGE_2 . Jedoch war kein radioaktiver Peak feststellbar, wenn entweder kein Enzym oder gekochtes Enzym eingesetzt wurde.

(c) Wurde der "Prostaglandinfleck" des chromatographierten Extraktes in dem Laufmittelsystem A1 von Green und Samuelsson (Benzol + Dioxan + Eisessig = 20 + 20 + 1, v/v) (90) rechromatographiert, zeigte sich eine radioaktive Zone mit einem R_f -Wert von 0,62, der mit dem Wert von PGE_2 übereinstimmt.

Für die quantitative Bestimmung der Prostaglandinausbeute wird, nachdem das Jod abgedampft ist, ein 2 cm breiter Streifen des Kieselgels von der Platte centimeterweise abgeschabt

und in Szintillationsröhrchen gefüllt. Die Radioaktivität in jedem Feld wird nach dem Vorschlag von Shaw und Ramwell (91) mit Hilfe von Bray'scher Lösung gezählt, die sich wie folgt zusammensetzt:

4,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
0,2 g POPOP (1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol)
60,0 g Naphthalin
20,0 g Äthylenglykol
100,0 g Methanol

Aufgefüllt auf einen Liter mit Dioxan

Das "Quenching" wird mit einem externen Standard bestimmt; es ergeben sich für alle Proben die gleichen Werte. Die Ergebnisse werden in Prozent Ausbeute der Arachidonsäure in Prostaglandin ausgedrückt. Dies wird berechnet, indem man zuerst von allen Impulsen pro Minute den mittleren Backgroundwert subtrahiert. Die Summe der Impulse pro Minute in der PG-Zone, dividiert durch die Summe der Impulse pro Minute in allen Feldern, multipliziert mit 100, ergibt somit Prozent Ausbeute. Da die Gesamtmenge an Arachidonsäure in mmol in jedem Ansatz bekannt ist, kann die reale Ausbeute leicht in absoluten Werten aus folgender Formel berechnet werden.

$$\frac{\% \text{ Ausbeute} \cdot 0,33^{*}) \cdot 352^{**})}{\text{Proteinendkonz.} \cdot 100} = \frac{\mu\text{g PGE}_2}{\text{mg Protein}}$$

*) = Molarität der Arachidonsäure im Ansatz

**) = Molekulargewicht von PGE₂

2.3. Radioimmunoassay von Prostaglandinen

2.3.1. Theorie

Mit Hilfe des Radioimmunoverfahrens können ng- bis pg-Mengen von Prostaglandinen in biologischem Material nachgewiesen und bestimmt werden. Diese Methode beruht auf der Verdrängung radioaktiv markierter Prostaglandine von hoch spezifischen Bindungsstellen einer standardisierten Menge eines Prostaglandinantikörpers durch nicht markiertes Prostaglandin.

Höhere Konzentrationen von nicht markiertem Prostaglandin ersetzen die radioaktive Form am Antikörper, der dann geringere Radioaktivität aufweist, wenn er aus der Lösung ausgefällt und in einem Liquid-Szintillationszähler gemessen wird. Dagegen bewirken kleinere Mengen von nicht-markiertem Prostaglandin, daß ein geringerer Anteil der markierten Substanz von der Bindungsstelle verdrängt wird und demzufolge mehr Radioaktivität in dem ausgefällten Antikörper zu finden ist. Mittels einer Verdünnungsreihe von ng- bis pg-Mengen nicht-markierten Prostaglandins kann eine Eichgerade gezeichnet werden, indem die Menge des nicht-markierten Prostaglandins gegen den prozentualen Anteil des radioaktiv-markierten Prostaglandins in der Antikörperfällung aufgetragen wird. Wenn unbekannte Mengen an Prostaglandin in einem Ansatz bestimmt werden sollen, wird der prozentuale Anteil des gebundenen, ausgefällten Isotops gemessen, und anhand der Eichgeraden kann der Gehalt an Prostaglandin in der Probe abgelesen werden.

Der in dieser Arbeit beschriebene Radioimmunoassay wurde von der Firma Clinical Assays, Inc. zur Messung von Prostaglandinen der Gruppen A, B und E entwickelt. Der darin verwendete Antikörper kann nicht zwischen den Prostaglandinen mit 1, 2 oder 3 Doppelbindungen unterscheiden. Prostaglandin E wird zuerst durch Natronlaugebehandlung quantitativ in PGB umgesetzt (92). Das entstehende PGB wird dann mit Hilfe des Antikörpers gegen PGB aus Kaninchen, wie unten beschrieben (Teil 2.3.3.2.), bestimmt. Der gebundene Anteil des ^3H -PGB₁ wird von der freien isotopischen Verbindung abgetrennt, indem das gebundene Prostaglandin mit einem weiteren Antikörper (Ziegen-Anti-Kaninchenserum) ausgefällt wird. Die einzelnen Schritte werden in folgendem Teil detaillierter beschrieben.

2.3.2. Gewebeaufbereitung und Prostaglandinisolierung

2.3.2.1. Vorbehandlung der Tiere

In den folgenden Experimenten (Teil 3.1.4.) werden männliche Ratten, die zwischen 150-250 g wiegen, verwendet. Es wird Gra-

nulationsgewebe in den Ratten erzeugt (Teil 2.1.), das einen Bildungszeitraum von 2-7 Tagen hatte. Die Versuche werden so ausgeführt, daß die Tötung aller Tiere am gleichen Tag erfolgt. Für jedes Wachstumsalter werden 9 bzw. 12 Kontrolltiere und 9 bzw. 12 behandelte Tiere eingesetzt, wobei jeweils Gewebe von 3 Tieren für einen Bestimmungsansatz zusammengegeben werden. Den behandelten Tieren wird entweder Styrylpyrimidin oder Indomethacin verabreicht. Styrylpyrimidin (0,25 mmol/kg Ratte) wird intraperitoneal, in 0,5 ml Erdnußöl suspendiert, am Tag der Ringeinsetzung injiziert. Indomethacin wird sowohl am Tag der Ringeinsetzung in einer Dosis von 10 mg/kg Tier als auch einen Tag vor der Tötung in einer Dosis von 3,0 mg/kg Tier in 0,5-1,0 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung in die Schwanzvene gespritzt. Kontrolltieren wird die gleiche Menge an Erdnußöl bzw. Kochsalzlösung verabreicht.

2.3.2.2. Gewebeaufbereitung

Das isolierte Granulationsgewebe wird nach der Tötung der Tiere sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser pulverisiert (siehe Teil 2.1.).

2.3.2.3. Isolierung der Prostaglandine

Die Prostaglandine werden aus dem gefrorenen, pulverisierten Granulationsgewebe nach einer modifizierten Methode von Hickler et al. (93) extrahiert. 0,5-1,0 g des tiefgefrorenen Pulvers werden zu einer Mischung von 4,0 ml kaltem Methylal (Formaldehyddimethylacetal) - absolutem Äthanol (3:1, v/v) in ein Schliffglas gegeben. Die Suspension wird kräftig geschüttelt und eine halbe Stunde stehengelassen. Das denaturierte Gewebeprotein wird in einer Zentrifuge bei 5000 g 10 Minuten lang sedimentiert. Der klare, gelbe Überstand wird dekantiert, und der Rückstand wird zwei weitere Male mit jeweils 3,0 ml der Methylal-Äthanol-Mischung extrahiert. Die organischen Phasen werden zusammengegeben und in einem Wasserbad bei 37 °C in einem Stickstoffstrom einge-

dampft.

Nach den Vorschriften von Clinical Assays sollte der Rückstand in einem Tris-Gel Puffer (pH = 7,4) aufgenommen werden, der sich wie folgt zusammensetzt:

0,01 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,14 M NaCl
0,66 ml konz. HCl/l
1,66 mM MgSO₄
0,15 mM CaCl₂
1,0 g Gelatine/l

Der pH wird mit HCl bzw. Tris-Base auf 7,4 eingestellt.

Es zeigt sich jedoch, daß der gelbe, ölige Rückstand nicht in diesem Puffer löslich ist, so daß weitere Aufarbeitungsschritte erforderlich sind. Es wird eine Verteilung zwischen Acetonitril und Petroläther (60-80 °C Sdp.) vorgenommen, um die Neutralfette von den polareren Substanzen (Prostaglandine) abzutrennen. Zu diesem Zweck wird der Rückstand in 5,0 ml Acetonitril aufgenommen und während einer halben Stunde in einem Wasserbad bei 37 °C gelöst. Die Acetonitrillösung wird zweimal mit 3,0 ml Petroläther extrahiert; die Prostaglandine befinden sich in der Acetonitrilphase, die bei 40 °C unter Stickstoff zur Trockene eingedampft wird. Es bleibt ein weißer, löslicher Rückstand zurück, der in 1,1 ml Tris-Gel Puffer aufgenommen wird. Die Lösung wird unter häufigem Schütteln eine halbe Stunde bei 37 °C äquilibriert. 1,0 ml dieser Lösung wird in die eine Seite einer Dialysekammer pipettiert, die durch eine Dialysemembran in zwei Zellen unterteilt wird. Die andere Zelle wird mit 1,0 ml Tris-Gel Puffer aufgefüllt. Die Proben werden bei langsamer Rotation (9 rpm) in der Kälte (4 °C) 48 Stunden dialysiert. Mit Hilfe von ³H-PGE₁ läßt sich nachweisen, daß der Prostaglandinaustausch nach dieser Zeit vollständig abgelaufen ist (Tab. 5). 50% der Prostaglandine befinden sich in der Zelle, die mit reinem Tris-Gel Puffer gefüllt worden ist. Diese Lösung wird als gereinigter Extrakt in dem Prostaglandinbestimmungsansatz eingesetzt, nachdem sie bei -20 °C (max. ca. 1 Woche) aufbewahrt wurde. Die Verlustraten bei dieser Aufarbeitungsmethode werden in Teil 3.1.4. dargestellt.

2.3.3. Ausführung der Bestimmung

2.3.3.1. Umsetzung in PGB

Ein Aliquot des gereinigten Extraktes wird 1:10 mit Tris-Gel Puffer verdünnt. 0,5 ml dieser verdünnten Lösung wird dann in ein Reagenzglas pipettiert und mit 0,01 ml 1n NaOH versetzt. Die gut durchmischten Ansätze werden verschlossen und genau 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt. Danach werden die Gläser erneut umgeschüttelt, und der alkalische Extrakt (pH = 12,0), der die zu PGB umgewandelten Prostaglandine enthält, wird direkt in die Bestimmung eingesetzt.

2.3.3.2. Bestimmungsansatz

Die Bestimmung wird in verschließbaren Plastikröhrchen (Eppendorf), 1,5 ml Gesamtvolumen, ausgeführt. In diese Röhrchen werden die Reaktionslösungen in der angeführten Reihenfolge pipettiert:

- 1,0 ml Tris-Gel Puffer, pH = 7,4
- 0,05 ml des umgesetzten Extraktes bzw. des
Standard-Prostaglandins
- 0,05 ml ^3H -PGB₁ (ca. 10.000 cpm)
- 0,01 ml PGB₁-Antiserum

Die Gläschen werden verschlossen, umgeschüttelt und eine Stunde bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert. Anschließend werden 0,10 ml Kaninchenserum und 0,10 ml Ziegen-Anti-Kaninchenserum zu jeder Probe hinzugefügt, und nach erneutem Umschütteln werden die Proben verschlossen 18-24 Stunden bei 4 °C stehengelassen. Danach werden die Ansätze zwei Minuten lang in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es wird ein kleiner, weißer Rückstand sedimentiert, der den ausgefällten Anti-PGB₁-Antikörper darstellt. Der Überstand wird dekantiert und verworfen. Um die radioaktive Lösung zu entfernen, die an den Wänden des Röhrchens anhaftet, werden diese sorgfältig mit Zellstoff ausgetrocknet. Das radioaktive Präzipitat wird in

1,1 ml 0,1n NaOH aufgenommen und bei 50 °C in Lösung gebracht (ca. 1 Stunde). 1,0 ml des gelösten Rückstandes wird in 10 ml Demilume (Packard) in einem Liquid-Szintillations-zähler gemessen. Da das "Quenching" in allen Versuchen praktisch gleich ist, wird der cpm-Wert direkt benutzt, um die Prozent gebundenen ^3H -PGB₁ nach folgender Formel auszurechnen:

$$\% \text{ gebunden} = \frac{\text{cpm}_x - \text{Background}}{\text{cpm}_t - \text{Background}}$$

Dabei bedeutet: cpm_x : die Zählimpulse/Minute in der unbekannten Probe;

cpm_t : die Zählimpulse/Minute der Gesamtradioaktivitätsmenge, die vom Antikörper gebunden wird, in Abwesenheit von nicht-markiertem PGB₁;

Background: die Zählimpulse/Minute, die durch unspezifisch an das Proteinpräzipitat gebundenes Isotop entstehen, wenn unmarkiertes Prostaglandin und PGB-Antiserum nicht im Ansatz vorhanden sind.

Die Menge Prostaglandin, die aus der Eichkurve abgelesen wird (Teil 2.3.1.), wird mit einem entsprechenden Faktor multipliziert, der sowohl die Extraktions- und Dialyse-Ausbeute als auch die Verdünnung und das Volumen des Extraktes berücksichtigt. Die in dieser Weise korrigierte Menge wird in ng PGE/g Feuchtgewicht des Gewebes ausgedrückt, wobei jeder Wert einen Mittelwert von zwei Bestimmungsansätzen darstellt. In jedem Experiment wird eine neue Eichkurve mit folgenden Prostaglandinmengen 8,2 , 25 , 74 , 220 , 667 pg und 2 ng Standard-PGB₁ aufgenommen, die in gleicher Weise wie die umgesetzten Gewebeextrakte behandelt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Prostaglandinsynthesekapazität und des Prostaglandingehaltes in Granulationsgewebe

3.1.1. Optimierung, Charakterisierung der Prostaglandin-synthetase-Methode mit Rindersamenblasenmikrosomen (RSBM)

In einer Serie von 10 Versuchen wurde gefunden, daß aus 100 g Feuchtgewicht der Rindersamenblasen zwischen 4,77 und 7,20 g Feuchtgewicht Mikrosomen (einschließlich Mitochondrien) (7.000-100.000 g Sediment) und zwischen 0,22 und 0,40 g mikrosomales Protein zu gewinnen waren. Der Proteingehalt der unverdünnten, feuchten Mikrosomen betrug zwischen 3,4 % und 6,4 %. Die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin betrug 30%-60%, je nach der Beschaffenheit der einzelnen Enzympräparationen. RSBM-Suspensionen konnten ca. 4 Wochen lang bei -20°C ohne wesentlichen Aktivitätsverlust gelagert werden.

In Abbildung 2 ist ein Chromatogramm eines Extraktes dargestellt, der sich nach einstündiger Inkubation bei 37°C von Arachidonsäure mit RSBM ergibt. Die R_f -Werte sind Durchschnittswerte von 71 Chromatogrammen. Es zeigt sich, daß in diesem Laufmittelsystem "A" die R_f -Werte von PGE_2 und $^3\text{H-PGE}_1$ identisch sind. Außer den Flecken, die in dieser Abbildung dargestellt sind, waren noch weitere stark durch Jod gefärbte Substanzen bei relativen Laufstrecken von ca. 0,9 sichtbar, die nicht radioaktiv waren und demzufolge nicht weiter untersucht wurden.

In drei Experimenten wurde die radioaktive Zone, die die gleiche Laufstrecke wie reines PGE_2 und $^3\text{H-PGE}_1$ im System "A" aufwies, von der Platte eluiert und erneut im System AI von Green und Samuelsson (90) chromatographiert, das eine Auftrennung von PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGA/B gestattet. 89,7 %, 89,5 % und 89,0 % der Radioaktivität konnten in dem PGE_2 -Bereich lokalisiert werden (R_f -Wert = 0,37). Wenn der Extrakt aus

einem Prostaglandinsynthetase-Ansatz zuerst in System "A" 15 cm weit entwickelt wurde und dann anschließend auf der gleichen Platte im System AI von Green und Samuelsson chromatographiert wurde, waren wiederum 91,0 % und 88,3 % der

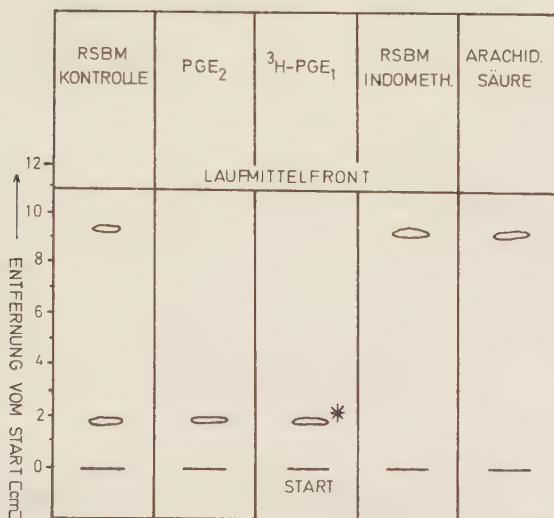


Abbildung 2: Dünnschichtchromatogramm von Prostaglandinen und Arachidonsäure.

Laufmittelsystem A: Diäthyläther + Petroläther (60-80 °C) + Methanol + Eisessig = 50 + 40 + 5 + 5

Laufmittelfront : 10,9 cm

Durchschnittliche R_f-Werte: (n=71)

Arachidonsäure : 0,87

³H-PGE₁ = PGE₂ : 0,17

Sichtbarmachung : Joddämpfe bzw. DC-Scanner*

radioaktiven Produkte in dem R_f-Bereich von reinem PGE₂ nachweisbar. In Granströms (94) Chromatographiesystem (Benzol + Dioxan + Eisessig = 80 + 20 + 2 , v/v) zeigten wiederum 82,6 % und 85,3 % der Umsetzungsprodukte aus Arachidonsäure die gleiche Laufstrecke wie PGE₂ (Abb. 3). Diese Experimente

deuten darauf hin, daß das verwendete prostaglandinsynthetisierende System hauptsächlich PGE_2 liefert, wie auch andere Autoren (85) gefunden haben.

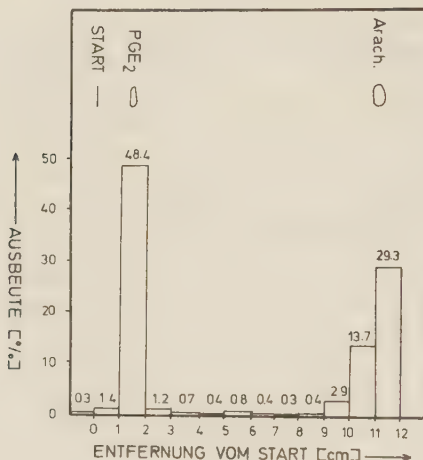


Abbildung 3: Dünnschichtchromatographische Verteilung von Folgeprodukten nach Inkubation von ^{14}C -Arachidonsäure mit RSBM.

Laufmittelsystem AI: Benzol + Dioxan + Eisessig = 80 + 20 + 2
 % Ausbeute an PGE_2 = 48,4 ; Anteil an PGE_2 von den gesamten Folgeprodukten = 85,3 %

Um die Zuverlässigkeit der Prostaglandinsynthetase-Methode zu überprüfen, wird die Streuung von verschiedenen hohen Ausbeuten an Prostaglandin sowohl mit dem Enzym in Rindersamenblasenmikrosomen als auch mit dem Enzymsystem in Nierenmarkhomogenaten (Teil 3.2.3.3.) ermittelt. Aus den Werten in Tabelle 1 ist ersichtlich, daß der relative mittlere Fehler (mittlerer Fehler des Mittelwerts dividiert durch den Mittelwert mal 100) größer wird, wenn die durchschnittliche Ausbeute sehr klein ist.

Tabelle 1: Überprüfung der Zuverlässigkeit der Prostaglandinsynthetase-Methode bei verschiedenen Prostaglandinausbeuten.

Enzym-system Aufber.	Protein- endkonz. (mg/ml)	% Ausbeute*) (PGE ₂)	relativer mittlerer**) Fehler (%)
RSBM wäßrig (0-4°C)	3,0	53,5 ± 0,7 n=6	1,3
"	1,8	26,5 ± 0,5 n=6	1,9
"	0,7	11,5 ± 0,1 n=6	0,9
Nieren- mark- homogenat flüss. N ₂	2,5	14,5 ± 0,3 n=4	1,7
"	1,0	5,57 ± 0,48 n=4	8,6
"	0,26	1,25 ± 0,09 n=5	7,2
"	0,18	1,09 ± 0,09 n=4	8,3

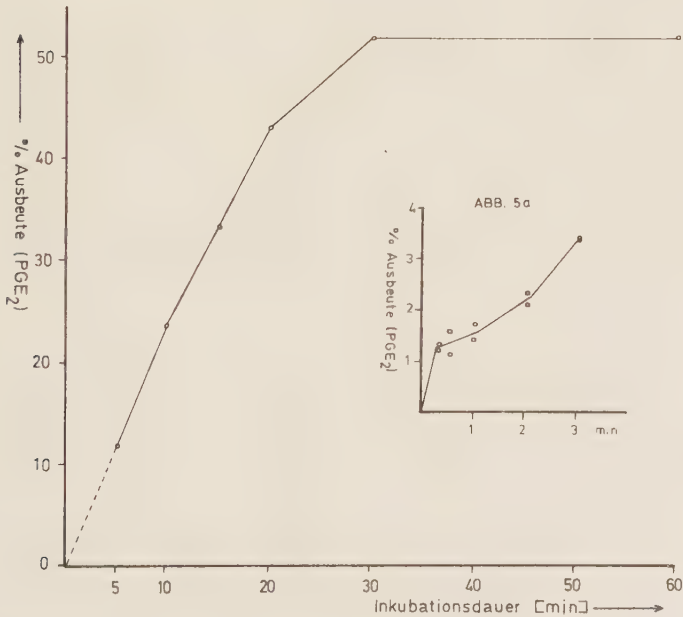
*) Mittelwert mit mittlerem Fehler des Mittelwerts (SEM)

**) Prozentualer Anteil des SEM am Mittelwert

Die prozentuale Ausbeute an Prostaglandin E_2 war nur bis zu einem gewissen Punkt linear von der Konzentration des Enzyms (bestimmt als Protein nach Lowry et al. (86)) im Ansatz abhängig. Selbst mit höheren Enzymkonzentrationen konnten keine größeren Prostaglandinausbeuten erzielt werden. In Abbildung 4 wird dieses Phänomen der eingeschränkten Linearität bei höheren Enzymkonzentrationen dargestellt. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht (56,87). Die Prostaglandinbiosynthese in Abhängigkeit von der Zeit wurde ebenfalls in Experimenten mit einer konstanten Synthetase-menge untersucht. Abbildungen 5 und 5a veranschaulichen einen typischen Versuch. Nach einer anfänglichen Verzögerungsphase in den ersten 5 Minuten werden die Prostaglandine in konstanter Menge mit der Zeit synthetisiert, jedoch bei einer Ausbeute von 50% nach 30 Minuten nimmt die Syntheserate ab, was möglicherweise auf eine Selbstzerstörung des Enzyms hinweist (55). Obwohl im Inkubationsmedium noch ein Überschuß an Substrat vorhanden ist, ist nach einer gewissen optimalen Ausbeute der Prostaglandinumsatz nicht mehr zu erhöhen. Daraus ergibt sich, daß eine exakte Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit ($PGE_2 / \Delta t$) nicht möglich ist, da die PGE_2 -Produktion nach der Verzögerungsphase nur für einen kurzen Zeitraum konstant abläuft. In der Regel liegt dieses Zeitintervall zwischen 10 und 20 Minuten nach Beginn der Reaktion. Wegen der großen Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wird in den folgenden Experimenten die Reaktion bis zur maximalen Syntheseausbeute laufen gelassen (ca. 1 Stunde). Die Synthesekapazität des Enzyms wird in Prozent Ausbeute angegeben, wie van Dorp vorgeschlagen hat (59). Dieser Ausdruck kann dann leicht in absolute Werte für PGE_2 umgerechnet werden (siehe Teil 2.2.2.3.). Um günstige pH-Bedingungen für die Inkubation herauszufinden, wurde die Synthetaseaktivität bei pH 7,4 und 8,5 gemessen. Da kein nennenswerter Unterschied in der Ausbeute festzustellen war (45,9 % bzw. 44,2 %, jeweils der Mittelwert von zwei Bestimmungen), wurde der pH der Inkubationslösung auf 8,5 festgelegt, um eine bessere Löslichkeit der Arachidonsäure zu gewährleisten.



Abbildung 4: Prostaglandinproduktion von RSBM in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Inkubationszeit: 60 Min.).



Abbildungen 5 und 5a: Prostaglandinproduktion von RSBM in Abhängigkeit von der Zeit.

3.1.2. Synthetase-Experimente mit Granulationsgewebe

Mit Hilfe der Prostaglandinsynthetase-Methode wird nun Granulationsgewebe auf Synthetaseaktivität untersucht.

3.1.2.1. Rohhomogenate von Granulationsgewebe

24 Ratten, die zwischen 270 und 300 g wogen, ergaben am 7. Tag 15 g Granulationsgewebe. Das Gewebe wurde aufbereitet, wie in Teil 2.2.1.3. beschrieben. Die Homogenate wurden unter den üblichen Inkubationsbedingungen (Teil 2.2.2.) bei einem pH von 7,4 und 8,5 auf Prostaglandinsynthetaseaktivität untersucht. Es wurden Blindwerte mit hitzeinaktiviertem (100 °C) Enzym parallel dazu durchgeführt, um eine eventuell auftretende unspezifische Umwandlung auszuschließen (56,88). Es konnte keine Radioaktivität in der PGE₂-Zone bei Proteinkonzentrationen von 7, 14 und 21 mg/ml nachgewiesen werden.

Ein weiteres Experiment wurde ausgeführt, um zu prüfen, ob kleinere Mengen von Prostaglandin synthetisiert worden waren, die jedoch sofort im Gewebe von prostaglandinabbauenden Enzymen metabolisiert worden sind. Da das wichtigste prostaglandinabbauende Enzym, PGDH, sowohl PGE₁ als auch PGE₂ angreift, wird das Gewebekomogenat zusammen mit ³H-PGE₁ 20 Minuten unter den üblichen Reaktionsbedingungen inkubiert. Ein Dünnschichtchromatogramm des Extraktes im Laufmittelsystem "A" zeigte, daß 98,5 % der gesamten Radioaktivität in der Prostaglandinzone vorhanden waren (Abb. 6a). Wurde dieses Chromatogramm wiederholt im System AI entwickelt, dann waren 96,8 % der Radioaktivität des Extraktes und 97,3 % der Radioaktivität von reinem ³H-PGE₁ in dem PGE₁-Peak nachweisbar (Abb. 6b). Bei der Verwendung eines dritten DC-Systems (Granström (94)) waren bei einem Rf-Wert von 0,51 radioaktive Verunreinigungen zu finden, die sowohl im Gewebekomogenat mit ³H-PGE₁ (0,88 %) als auch in einer Vergleichsprobe von ³H-PGE₁ (1,46 %) vorhanden waren. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die markierte Verbindung Verunreinigungen enthielt, die nicht durch enzymatische Umsetzung entstanden waren (Abb. 6c).

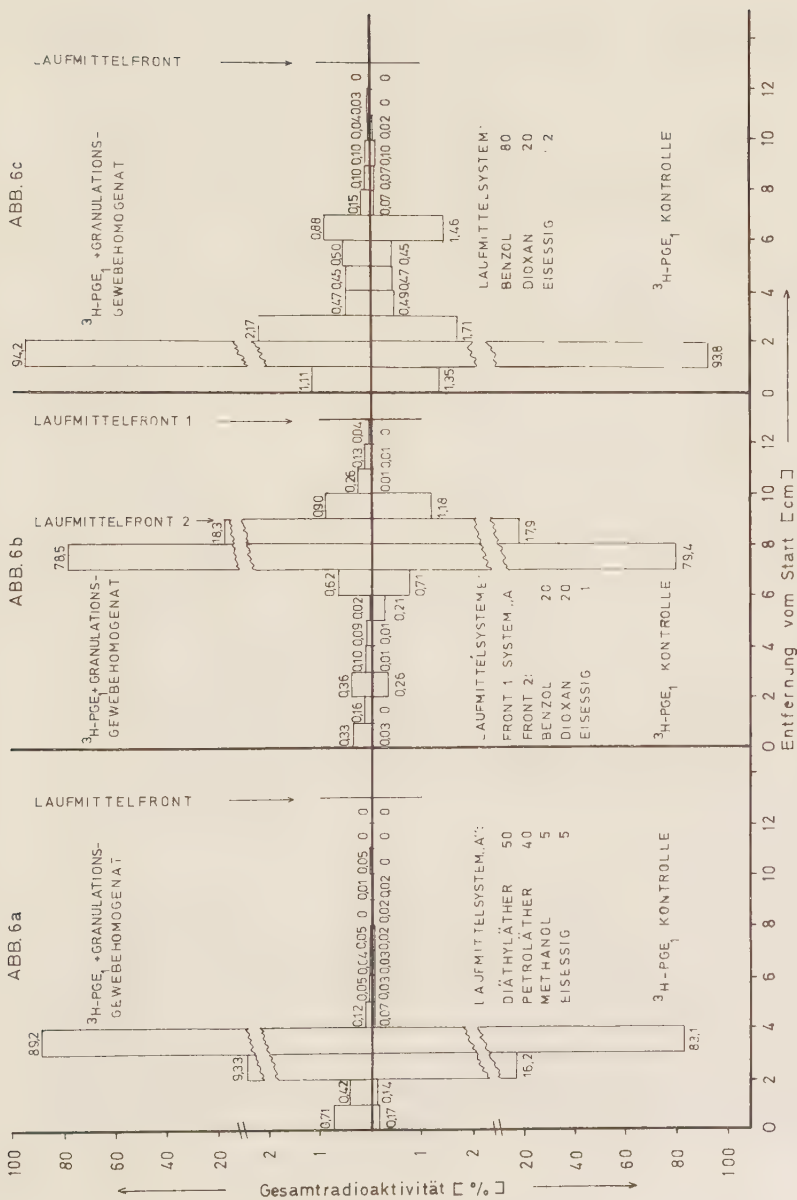


Abbildung 6: Dünnschichtchromatogramme zur Überprüfung auf Prostaglandinabbau durch Granulationsgewebe.

3.1.2.2. Mikrosomen aus Granulationsgewebe

Da in den Rohhomogenaten des Granulationsgewebes keine Prostaglandinsynthese nachzuweisen war, wurden Mikrosomenpräparationen auf Syntheseaktivität untersucht. Dieses erschien sinnvoll, weil zuvor von anderen Autoren die höchsten Prostaglandinsynthetaseaktivitäten in der Mikrosomenfraktion von mehreren Geweben mit geringer Synthesekapazität, einschließlich Epidermis (54), Fettgewebe (53) und Hirnrinde (95), gefunden wurden.

In der Regel waren 10-20 g Granulationsgewebe nötig, um ausreichende Mengen Mikrosomen für die Enzymexperimente zu erhalten, was eine große Anzahl von präparierten Versuchstieren erforderte. Der Protein- und Mikrosomengehalt des Granulationsgewebes schwankte beträchtlich in den Vorversuchen. In 10 g 7 Tage altem Granulationsgewebe wurden 0,11-0,40 g Feuchtwicht Mikrosomen und 0,010 g - 0,052 g mikrosomales Protein gefunden. Der Proteingehalt der unverdünnten Mikrosomensuspension betrug zwischen 5,4 und 13,2 mg/100 mg Feuchtwicht Mikrosomen. In einem Vorversuch wurden Gewebemikrosomen von zwei Gruppen von Tieren untersucht. Eine Gruppe wog zwischen 150-170 g, die andere zwischen 270 und 300 g. Die Proteinkonzentration in jedem Ansatz betrug 6,75 mg/ml bzw. 5,00 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml. Es zeigte sich, daß 7 Tage altes Granulationsgewebe 80 ng bzw. 73 ng PGE_2 /mg Protein für die beiden Tiergruppen produzierte. Dies entspricht einer PGE_2 -Ausbeute von 0,46 % bzw. 0,31 %, wobei jeder Wert einen Mittelwert von zwei Bestimmungen darstellt.

In einem weiteren Versuch wurden Mikrosomen isoliert von vier Gruppen von Ratten, deren Granulationsgewebe sich verschieden lange Zeit gebildet hatte, um zu prüfen, ob der Reifegrad des Gewebes mit der Prostaglandinsynthetasekapazität in Zusammenhang steht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die durchschnittlichen Ausbeuten, pro mg Protein ausgedrückt, waren in den vier Gruppen annähernd gleich und sind daneben außerordentlich

klein. Sie liegen an der unteren Nachweisgrenze dieser Methode.

Tabelle 2: Umsatz von Arachidonsäure in PGE_2 durch Mikrosomen aus Granulationsgewebe verschiedenen Alters.

Gewebealter	Proteinkonzentration (mg/ml)	% Ausbeute PGE_2 *)	$\frac{\text{ng } \text{PGE}_2}{\text{mg Protein}}$
9 Tage	7,7	0,48	73
		0,49	74
		0,39	60
7 Tage	5,5	0,33	71
		0,36	77
		0,27	58
5 Tage	5,3	0,30	67
		0,44	98
		0,27	60
3 Tage	5,7	0,40	82
		0,24	50

*) Angaben für % Ausbeute (bzw. ng PGE_2) sind Einzelbestimmungen; für unspezifischen Umsatz wird eine Korrektur durch Kontrollwerte mit inaktiviertem (gekochtem) Enzym vorgenommen.

3.1.3. Synthetase-Experimente mit anderen Geweben

Die prostaglandinsynthetisierende Aktivität von Granulationsgewebe muß mit der Aktivität anderer Rattengewebe verglichen werden, bevor gesagt werden kann, daß dieses Gewebe eine absolut niedrige Synthetasekapazität besitzt. Falls die gefundene niedrige Enzymaktivität in Granulationsgewebe mit geringen Aktivitäten in anderen Rattengeweben einhergeht, dann kann dieser kleine Umsatz eher ein Charakteristikum der Spe-

zies sein als ein Merkmal des Gewebes selbst. Stellt es sich andererseits heraus, daß Granulationsgewebe im Vergleich zu den übrigen Geweben der Ratte wenig Aktivität aufweist, dann können leichter Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung dieses Befundes gezogen werden (siehe Diskussion). Aus diesem Grunde wurde die prostaglandinsynthetisierende Kapazität von mehreren Rattengeweben gemessen (Tab. 3). Es ist ersichtlich, daß diese Gewebe Prostaglandine in niedrigen bis mittleren Mengen produzieren können, sogar bei Messungen mit Rohhomogenaten. Daraus ist zu schließen, daß Granulationsgewebe zu der Gruppe der Gewebe mit besonders geringer Synthesekapazität gehört (50).

Tabelle 3: Prostaglandinsyntheseaktivität in verschiedenen Rattengeweben.

Gewebe- art	Proteinkon- zentration (mg/ml)	% Ausbeute PGE ₂ *)
Magenschleim- hauthomoge- nat **)	10,0	1,5 1,1
Samenblasen- homogenat **)	10,0	1,1
Hautmikroso- men (Dermis u. Epidermis)***)	6,3	0,34
Nierenrinden- mikrosomen***)	12,0	0
Nierenmark- Homogenat ***)	6,3	3,4
	8,0	4,5
	8,0	3,3

*) Jeder Wert = Einzelbestimmung

***) Aufbereitet in flüssigem Stickstoff

****) Aufbereitet bei 0-4 °C in Tris-HCl Puffer

3.1.4. Radioimmunoassay der Prostaglandine in Granulationsgewebe

Da die Prostaglandinausbeute in Granulationsgewebe so außerordentlich gering ist, weisen die Ergebnisse große Schwankungsbreiten auf. Damit wäre eine Aussage über den Einfluß von Pharmaka auf dieses wenig aktive Synthesystem nur sehr eingeschränkt möglich. Neben der prostaglandinsynthetisierenden und -abbauenden Kapazität ist die absolute Menge an Prostaglandin im Gewebe eine Einflußgröße, die mit Hilfe des Radioimmunoassay-Verfahrens erfaßt werden kann. Daher soll die Wirkung von einigen Pharmaka auf den Prostaglandin-gehalt im Granulationsgewebe untersucht werden.

Für die Bestimmung der Prostaglandine ist ein Aufarbeitungsgang zu deren Isolierung und Anreicherung notwendig. Um die Verluste an Prostaglandin während dieser Isolierungsschritte zu überprüfen, werden Wiederfindungsversuche durchgeführt, indem $^3\text{H-PGE}_1$ dem zu extrahierenden Gewebe zugefügt wird. Die Wiederfindung wird in Tabelle 4 schematisch dargestellt.

Weiterhin wurden die Effizienz und die Dauer bis zur Einstellung des Gleichgewichts im Dialyseverfahren kontrolliert; diese Daten sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß eine Dialysedauer von 48 Stunden ausreichend ist.

In Abbildung 7 ist eine typische Eichkurve aufgezeichnet, wie sie für die radioimmunologische Bestimmung von Prostaglandin verwendet wurde. Der abfallende Verlauf kommt dadurch zustande, daß mit steigenden Konzentrationen von Standard-PGB₁ zunehmende Mengen von radioaktivem $^3\text{H-PGB}_1$ von der spezifischen Antikörperbindungsstelle verdrängt werden, was zur Folge hat, daß weniger Radioaktivität im ausgefällten Antikörper nachweisbar ist. Diese Kurve zeigt außerdem, daß Standard-Prostaglandinmengen reproduzierbar bestimmt werden können.

Der Prostaglandin-gehalt von Granulationsgewebe wurde in den folgenden Versuchen gemessen. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse von 11 Versuchen, in denen die Prostaglandine von 3, 5 und 7 Tage altem Granulationsgewebe bestimmt wurden. Es ist ersicht-

Tabelle 4: Effektivität der Prostaglandin-Extraktions-Methode für den Radioimmunoassay.

70836 ± 1355 cpm ^{*)}	=	100 % Zugabe
3 x Extraktion mit Methylal/Äthanol		
65687 ± 1705 cpm	=	94,4 % Wiederfindung
2 x Verteilung Petroläther/Acetonitril		
51700 ± 1518 cpm	=	73,1 % Gesamtwiederfindung
48 hrs Dialyse		
50700 cpm	=	71,7 % Gesamtwiederfindung

*) Mittelwert mit mittlerem Fehler des Mittelwertes, n=4

lich, daß die Menge an Prostaglandinen von $89,8 \pm 12,1$ ng/g Feuchtgewicht in jungem Granulationsgewebe auf $48,4 \pm 7,6$ ng/g Feuchtgewicht in älterem Gewebe absinkt (Mittelwerte $\pm$ SEM). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant, weist jedoch eine große Streuung auf.

In einem weiteren Versuch wurde der Prostaglandingehalt des Granulationsgewebes von Kontrolltieren und von Tieren verglichen, die zuvor mit 0,25 mmol/kg Körpergewicht i.p. Styrylpyrimidin behandelt wurden. Dabei wurde wieder Gewebe von unterschiedlichem Alter untersucht (2-7 Tage). Aus diesem Versuch (Abb. 9a) ist zu entnehmen, daß die Prostaglandine in Mengen von ca. 130-180 ng/g Feuchtgewicht im Granulationsgewebe von behandelten und unbehandelten Tieren vorhanden sind, und daß ihre Konzentration in älterem Gewebe (7 Tage alt) abfällt bis auf ca. 35 ng/g Feuchtgewicht. Große Schwankungen, die bei den einzelnen Messungen auftreten, erschweren eine genaue Interpretation der Daten, insbesondere ist kein signifikanter Effekt durch Styrylpyrimidin erkennbar. Die

Tabelle 5: Austausch von ^3H -PGE₁ mittels Gleichgewichtsdialyse in Abhängigkeit von der Zeit.

Dialyse- dauer (hr)	vordere Kammer (cpm)*)	hintere Kammer (cpm)*)	Wieder- findung (%)	Austausch (%)
0	16413 $\pm$ 250, n=3	0	100	0
2,5	13623 $\pm$ 263, n=3	2743 $\pm$ 118, n=3	99,8	16,7
7	10306 $\pm$ 102, n=3	5690 $\pm$ 102, n=3	97,5	35,5
26	9226 $\pm$ 54, n=3	6900 $\pm$ 13, n=3	98,2	42,7
48	7827 $\pm$ 121, n=3	7870 $\pm$ 12, n=3	95,8	50,0
96	8153 $\pm$ 42, n=3	7967 $\pm$ 38, n=3	98,3	49,5

*) Mittelwert mit mittlerem Fehler des Mittelwertes

gleichen Einschränkungen treffen für Abbildung 9b zu, die den Effekt des wirkungsvollen Prostaglandinsynthetasehemmstoffs Indomethacin auf den Prostaglandingehalt in vivo darstellt. Der Abfall der Prostaglandinmenge in 2-7 Tage altem Granulationsgewebe ist sowohl in behandelten (10 mg/kg Körpergewicht i.v. in 0,9%igem NaCl am Tag der Ringsetzung und 3 mg/kg einen Tag vor der Tötung) als auch in unbehandelten Tieren sichtbar. Gleichzeitig ist zu erkennen, daß die mit Indomethacin behandelten Tiere einen erwartungsgemäß niedrigeren Prostaglandingehalt aufweisen. Jedoch wird durch die großen Schwankungen der einzelnen Meßwerte die Aussagekraft stark eingeschränkt. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, daß der Radioimmunoassay nur mit einer größeren Anzahl von Meßwerten brauchbar ist, um die Wirkung von verschiedenen Pharmaka auf den Prostaglandingehalt im Granulationsgewebe zu untersuchen.

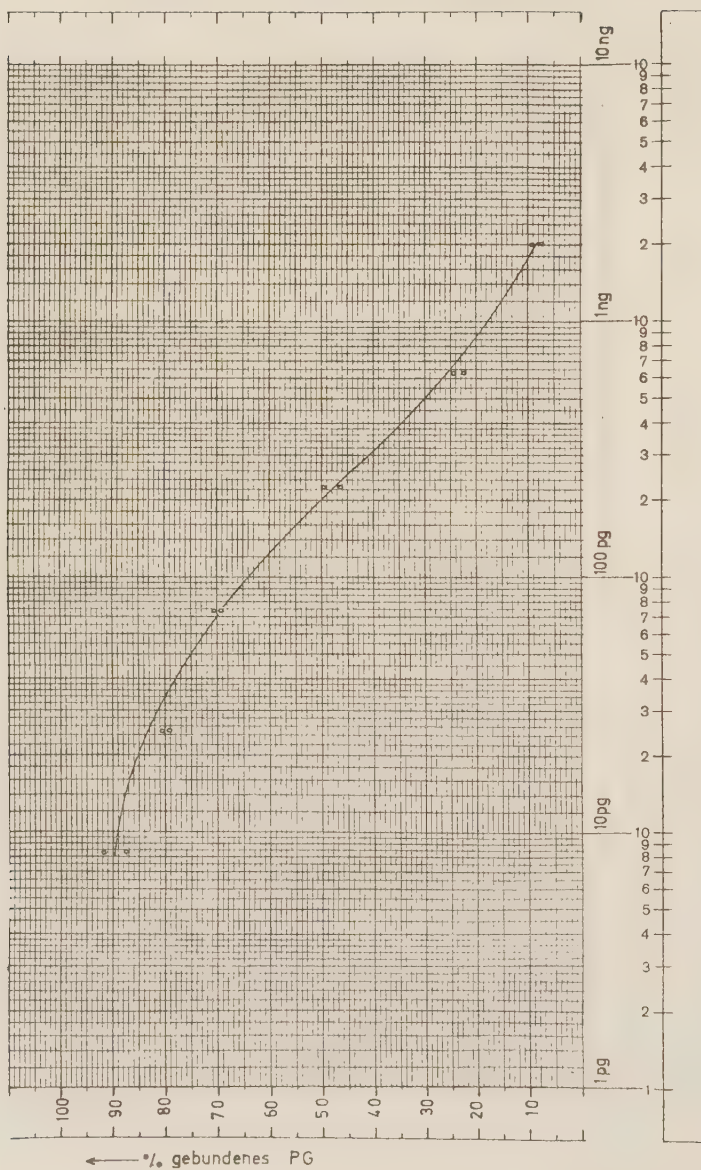


Abbildung 7: Eichkurve für die radioimmunologische Prostaglandinbestimmung.

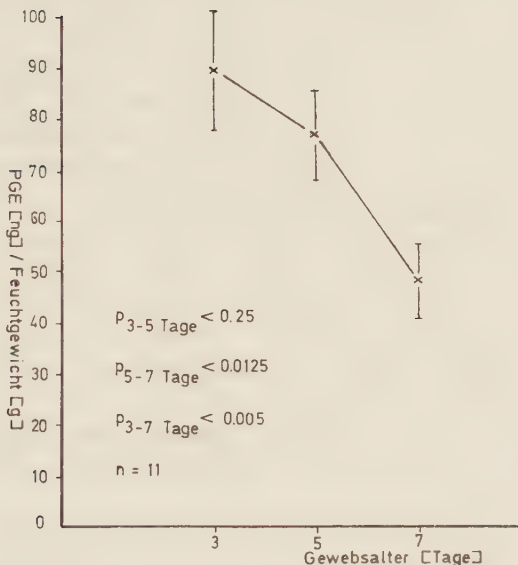


Abbildung 8: Gewebeskonzentration an PGE in Abhängigkeit vom Gewebsalter.

Mittelwerte mit mittleren Fehlern der Mittelwerte

3.2. Pharmakologische Untersuchungen mit Prostaglandinsynthetase hoher Aktivität

Die geringe Prostaglandinsynthetaseaktivität in Granulationsgewebsmikrosomen, verbunden mit den praktischen Problemen, ausreichendes Ausgangsmaterial für die Versuche zu erhalten, und die großen Schwankungen bei den Ergebnissen des Radioimmunoassays führten dazu, daß weitere pharmakologische Untersuchungen mit dem hoch aktiven Prostaglandinsynthetase-System der Rindersamenblasen durchgeführt wurden. Es konnte schon von Tomlinson et al. (85) gezeigt werden, daß ein deutlicher Zusammenhang besteht zwischen der anti-entzündlichen Wirksamkeit

Abbildung 9a: Prostaglandin-E-Konzentration in Granulationsgewebe von Styrylpyrimidin-behandelten und Kontrolltieren in Abhängigkeit vom Gewebsalter.

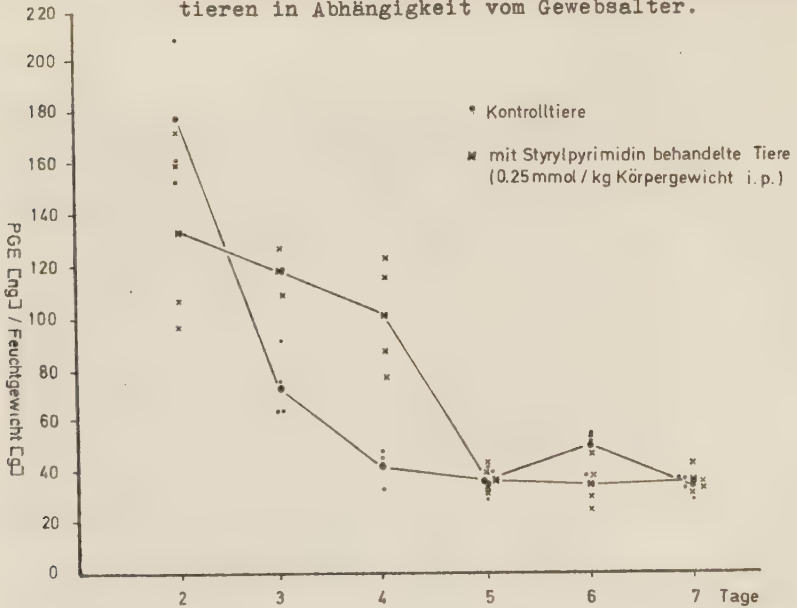
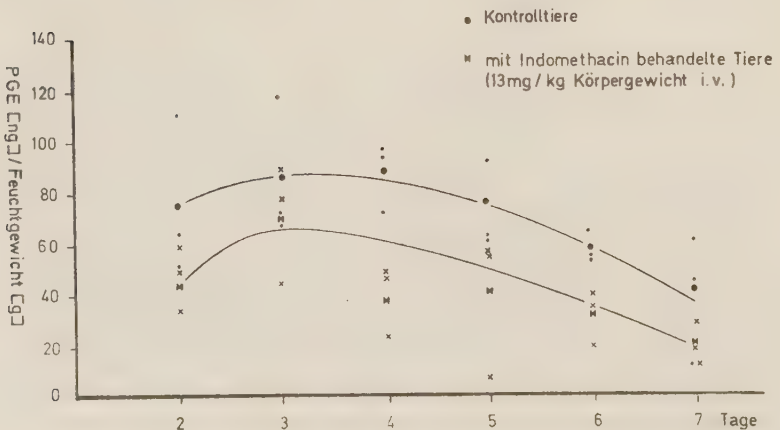


Abbildung 9b: Prostaglandin-E-Konzentration in Granulationsgewebe von Indomethacin-behandelten und Kontrolltieren in Abhängigkeit vom Gewebsalter.



einiger Pharmaka und ihrer Fähigkeit, die Prostaglandinbiosynthese in RSBM zu hemmen. Im Hinblick auf diese Befunde wurden das RSBM-System und später Enzymsysteme anderer Gewebe angewandt, um die drei folgenden Substanzgruppen zu untersuchen, von denen bekannt ist, daß sie die Entzündung und die Zellvermehrung beeinflussen:

- (a) Lipopolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa*, das zu einer Beschleunigung der Wundheilungsvorgänge führt (96-98), sowie mehrere Fettsäuren, die in der Lipid A-Fraktion vorhanden sind;
- (b) mehrere triterpenoide Steroide, die die Heilung von Magenulcera fördern (115) und die auch antiphlogistische Eigenschaften aufweisen (113,114);
- (c) 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin und einige verwandte Verbindungen, die die Zellvermehrung in den Nieren von Versuchstieren verursachen.

3.2.1. Lipopolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa*

Eine mögliche Beeinflussung der Prostaglandinsynthetase durch Lipopolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde mit Hilfe des Rindersamenblasenmikrosomen-Systems geprüft. Es wurde eine Mischung von LPS aus 7 verschiedenen häufig vorkommenden Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* ausgewählt wegen ihrer hohen Reinheit und Verfügbarkeit (*Pseudomonas heptavalentes* Antigen, je 0,12 mg/ml von 7 verschiedenen Immuntypen (106)). Zusätzlich wurden einige Fettsäuren, die von anderen Arbeitsgruppen aus der Zellwand von *Pseudomonas* und anderen gramnegativen Bakterien isoliert worden waren (107-110), in die Experimente aufgenommen.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Weder *Pseudomonas* LPS in einer Konzentration von 100 µg/ml (entspricht der 100-1000-fachen Dosis für die Fiebererzeugung und der 2-20-fachen Menge, die für die Schwartzman-Reaktion (111) erforderlich ist) noch die Fettsäuren hatten, selbst in hoher Konzentration, einen Einfluß auf die Prostaglandinproduktion. Dagegen zeigten Blind- und Kontrollwerte, daß ein funktionierendes System vorlag.

Tabelle 6: Prostaglandinsynthetaseaktivität von RSBM
in Gegenwart von LPS und Fettsäuren.

Testsubstanz	Konzentration im Ansatz	% Ausbeute (absol.)	% Ausbeute rel.Kontr.	% Inhi- bition
2-Hydroxy- dodecansäure	1 mM	28,9 26,0	91,4	8,6
Decansäure	1 mM	26,0 28,3	90,4	9,6
Laurinsäure	1 mM	26,7 23,6	83,7	16,3
Myristin- säure	1 mM	25,1 26,4	85,7	14,3
Palmitin- säure	1 mM	23,0 29,8	87,9	12,1
cis-Vaccen- säure	1 mM	25,1 28,4	89,0	11,0
Pseudomonas aeruginosa heptavalen- tes Antigen	100 µg/ml	28,5 28,9	95,5	4,5
Äthanol (Kontrolle)	33 µl/ml	30,7 29,4	100	0
Indometh- acin	0,1 mM	0,47 0,62	1,9	98,1

3.2.2. Steroide

Um herauszufinden, ob 18 β -Glycyrrhetinsäure und ihre Derivate die Prostaglandinsynthetase beeinflussen, wurden sie neben drei anderen Steroiden zum Vergleich untersucht. Die Ergebnisse einiger Versuche sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Prostaglandinsynthetaseaktivität von RSBM in Gegenwart von Glycyrrhetinsäurederivaten und anderen Steroiden.

Testsubstanz	Konzentration im Ansatz	% Ausbeute (absol.)	% Ausbeute rel.Kontr.	% Inhibi- tion
18 β -Glycyrrhetinsäure	1 mM	6,8 6,9 (Ko= 30,1)	22,7	77,3
Carbenoxolon-Na	1 mM	32,4 32,5 (Ko= 47,9)	68,0	32,0
Prednisolonhemisuccinat	1 mM	29,9 29,8 (Ko= 30,1)	98,9	1,1
Aldosteron	1 mM	43,3 (Ko= 55,3)	78,5	21,5
Cortison	1 mM	49,4 (Ko= 55,3)	89,5	10,5

18 β -Glycyrrhetinsäure verminderte die Prostaglandinproduktion um 77% und Carbenoxolon um 32% bei einer Konzentration von jeweils 1,0 mM. Die Hemmung schien selektiv zu sein, da Aldosteron, Prednisolonhemisuccinat und Cortison bei vergleichbaren Konzentrationen keine oder minimale Wirkung ausübten. Einschränkung muß gesagt werden, daß Aldosteron bei hoher Konzentration eine geringfügig hemmende Wirkung zeigte, was mit

den Befunden von Flower et al. (112) übereinstimmt.

In weiteren Experimenten wurde die Hemmwirkung von 18 β -Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon (Abb. 10) mit der von anderen Hemmstoffen, nämlich Acetylsalicylsäure und Indomethacin (Abb. 11), direkt verglichen, wobei dieselbe Enzympräparation eingesetzt wurde. Daraus ist ersichtlich, daß sowohl 18 β -Glycyrrhetinsäure (ID₅₀ = 0,42-0,68 mM) als auch Carbenoxolon (ID₅₀ = 0,89 mM) etwas stärkere Prostaglandinsynthetaseinhibitoren sind als Acetylsalicylsäure (ID₅₀ = 1,13 mM).

In Abbildung 13 ist ein Versuch dargestellt, in dem die Prostaglandinsynthese in einem Zeitraum von 2 Stunden in Gegenwart und Abwesenheit von 18 β -Glycyrrhetinsäure untersucht wurde. Diese Befunde werden in Teil 3.2.3.1.2. diskutiert.

3.2.3. 2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin und Pteridin-derivate

3.2.3.1. Styrylpyrimidinwirkung in Rindersamenblasen-mikrosomen

Mit Hilfe des RSBM-Systems wurde die Wirkung von STAP und einigen Pteridinen (Abb. 12, 17), die Nierenvergrößerung verursachen, auf die Prostaglandinbiosynthese untersucht. Einige Pteridine, die nicht eine Zellproliferation in der Niere auslösen, und einige Strukturanaloga von STAP wurden als Vergleichssubstanzen in die Versuche aufgenommen (Abb.12). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dargestellt. Styrylpyrimidin hemmt die Prostaglandinproduktion bei einer Konzentration von 1,0 mM fast vollständig (Abb. 10, 11). Die anderen Verbindungen waren relativ unwirksam außer Stilbazol (2-Styrylpyridin), das sich als sehr wirksam erwies.

Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, daß STAP bei einer Konzentration von 1,0 mM (und auch 18 β -Glycyrrhetinsäure, 1,0 mM, siehe Teil 3.2.2.) sowohl die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit ($PGE_2/\Delta t$ bis 20 Minuten) als auch die Gesamtsynthese von Prostaglandin nach maximaler Umsetzung vermindert.

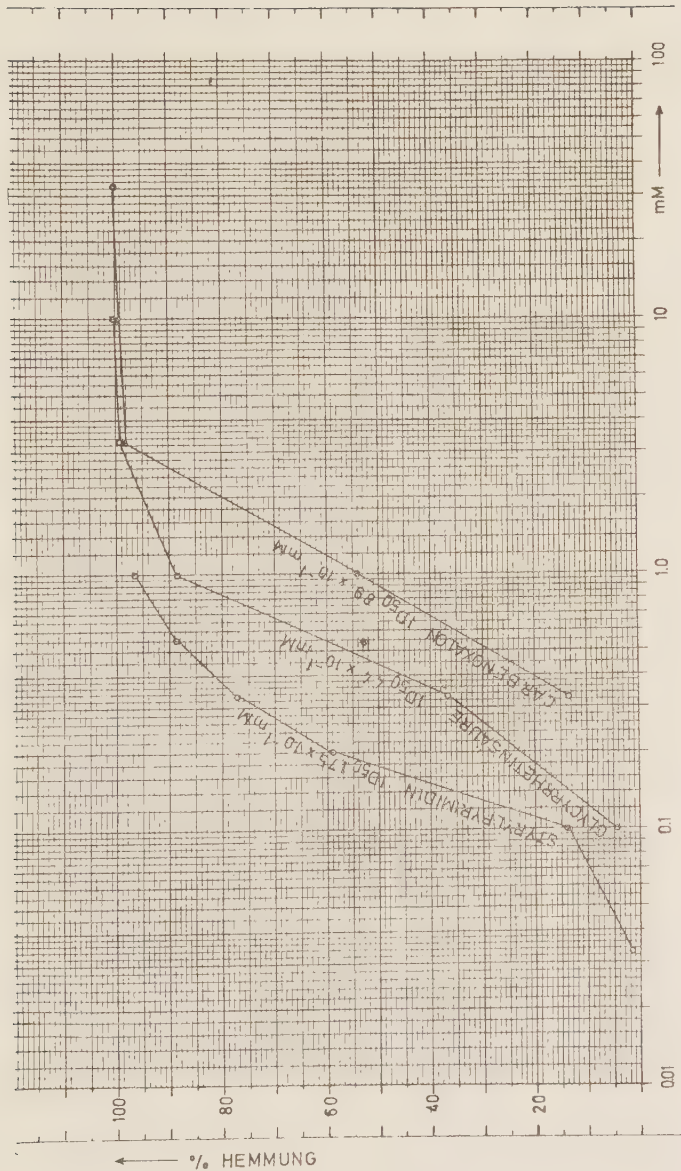


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Styrylpyrimidin, Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon im RSEM-System.

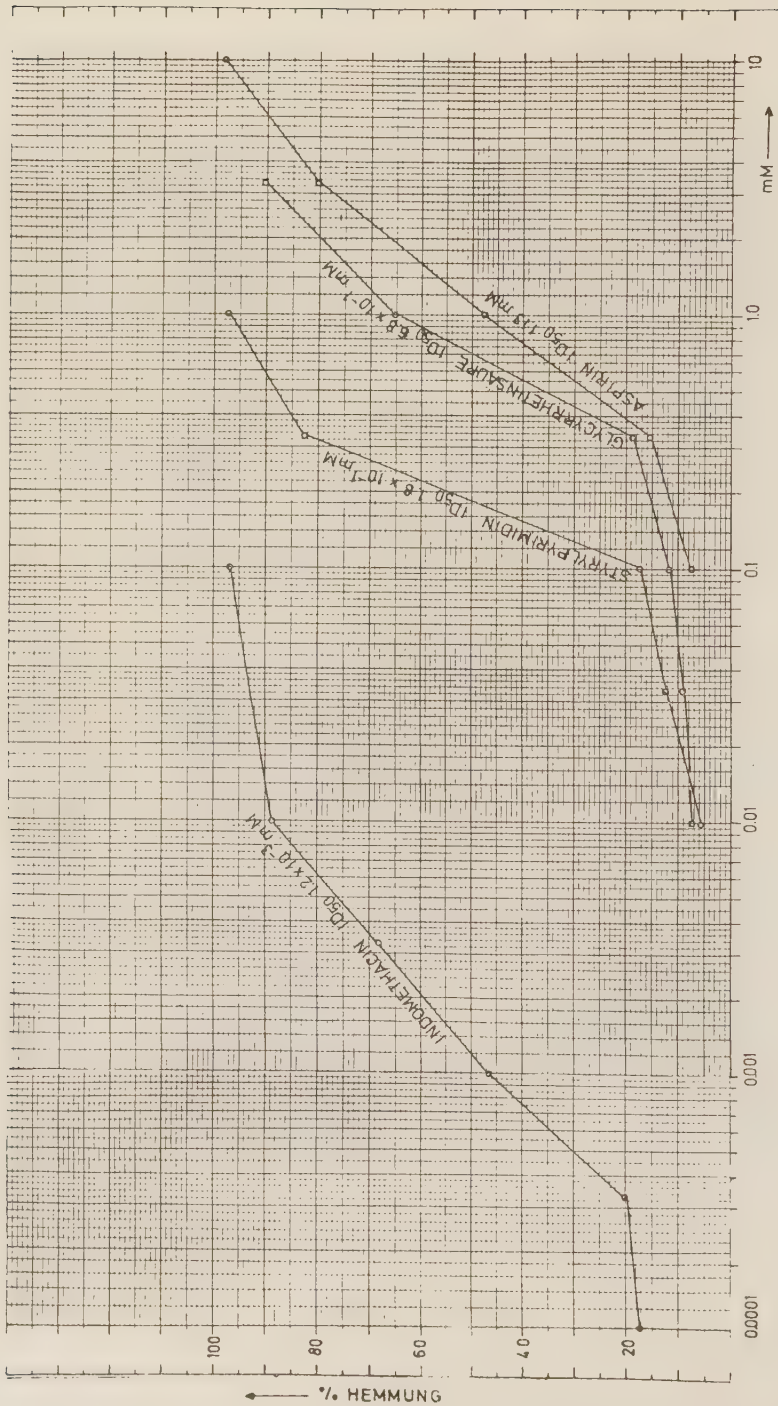


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Indomethacin, Styrylpyrimidin, Glycyrrhetinsäure und Aspirin im RSEM-System.

Tabelle 8: Prostaglandinsyntheseaktivität von RSBM in Gegenwart von Styrylpyrimidin und anderen Verbindungen.

Testsubstanz	Konzentration im Ansatz	% Ausbeute (absol.)	% Ausbeute rel. Kontr.	% Inhibi- tion	Nieren- vergrö- ßernder Effekt*)
2,4,5-Triami- no-6-styryl- pyrimidin	1 mM	1,0 0,7 (Ko= 30,1)	2,9	97,1	121 + (123) 124
Xantho- pterin	1 mM	47,3 43,5 (Ko= 47,9)	94,5	5,5	+ (121) (124)
2-Amino- -4-hydroxy- pteridin	1 mM	35,4 31,0 (Ko= 40,0)	83,1	16,9	+ (120)
Folsäure	1 mM	33,7 37,3 (Ko= 40,0)	88,7	11,3	124 + (147) 148
Methotrexat	1 mM	37,2 38,5 (Ko= 40,0)	94,7	5,3	- (124)
Pyrimeth- amin	1 mM	50,9 45,1 (Ko= 55,3)	87,0	13,0	
Trimetho- prim	1 mM	51,3 52,7 (Ko= 55,3)	94,1	5,9	
Triamteren	gesätt. Lös.	49,9 52,7 (Ko= 55,3)	92,8	7,2	- (124)
Amilorid	1 mM	27,0 25,6 (Ko= 30,1)	87,4	12,6	
2-Styryl- pyridin (Stilbazol)	1 mM	0,9 (Ko= 30,1)	3,0	97,0	

*) Ziffer in Klammern = Literaturangaben

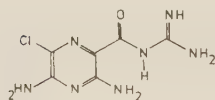
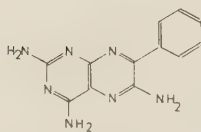
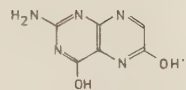
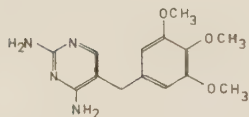
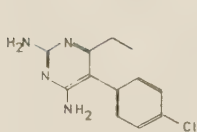
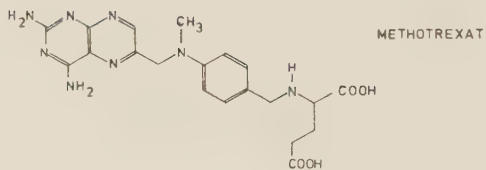
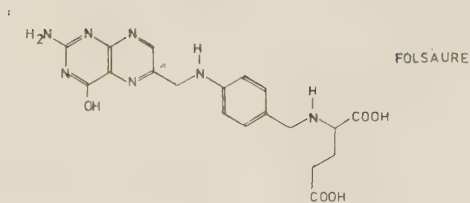


Abbildung 12: Chemische Formeln zu Verbindungen
in Tabelle 8.

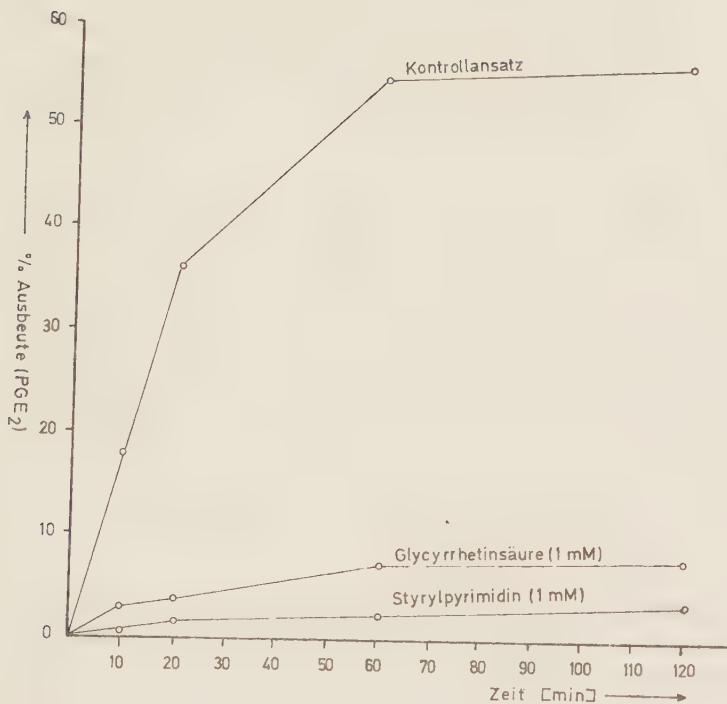


Abbildung 13: Prostaglandinproduktion im RSBM-System in Abhängigkeit von der Zeit in Gegenwart von Glycyrrhetinsäure und Styrylpyrimidin.

Die Kurve der gehemmten Reaktionen ist im wesentlichen unverändert und zeigt den gleichen Verlauf wie die der Kontrollreaktion, nämlich einen schnellen Reaktionsablauf in der ersten Stunde, der sich danach stark verlangsamt, wie es durch den asymptotischen Verlauf der Kurve dargestellt ist. Weiterhin ist aus dieser Abbildung zu entnehmen, daß in den gehemmten Reaktionsansätzen selbst nach zwei Stunden keine weiteren Prostaglandine synthetisiert werden. Da die Prostaglandinausbeute nahezu linear von der Enzymkonzentration abhängig ist (Abb. 4), kann postuliert werden, daß die Inhibitoren die Nettomenge an aktivem Enzym in dem System vermindern.

STAP erwies sich als ein bemerkenswert starker Synthetasehemmstoff (Abb. 10, 11) im RSBM-System, mit einer ID_{50} von ca. 0,10-0,20 mM. Diese Verbindung ist damit ein 10-fach stärkerer Hemmstoff als Acetylsalicylsäure und ist 100mal schwächer als Indomethacin. STAP ist somit eine Substanz mit mittlerer Hemmwirkung (Tab. 9); sie liegt zwischen der von Phenylbutazon und Mefenamsäure (129) und sollte demzufolge nach der Hypothese von Vane (15) anti-entzündliche Eigenschaften aufweisen.

3.2.3.2. Untersuchungen auf anti-phlogistische Eigenschaften von STAP

Mögliche antiphlogistische Eigenschaften des Styrylpyrimidins wurden mit Hilfe der Ring-Granulom-Methode (Teil 2.1.) untersucht. STAP wurde in verschiedenen Dosen lokal auf die Wundoberfläche appliziert oder i.p. in Erdnußöl injiziert. Die Substanz wurde entweder am Tag der Ringeinsetzung oder einen Tag später verabreicht. Dieses Dosierungsschema wurde gewählt, weil Rudas (130) zuvor gefunden hatte, daß Phenylbutazon und Natriumsalicylat das Wachstum des Granulationsgewebes nur hemmten, wenn die Pharmaka unmittelbar nach der Ringeinsetzung gegeben wurden. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse von einer großen Anzahl von Experimenten zusammengestellt. Es ist erkennbar, daß die lokale Applikation von STAP

Tabelle 9: Vergleich von ID₅₀-Werten aus der Literatur gegenüber selbst gefundenen Werten von anti-entzündlichen Substanzen.

Testsubstanz	ID ₅₀ in RSBM (Literaturwerte (129)) (mM)	ID ₅₀ in RSBM (eigene Werte) (mM)
Indomethacin	$2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$ $2,1 \cdot 10^{-3}$
Mefenamsäure	$1,5 \cdot 10^{-2}$	-
2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin	-	0,09 0,18 0,18
Phenylbutazon	0,42	-
Carbenoxolon-Natrium	-	0,89
18ß-Glycyrrhetinsäure	-	0,42 0,68
Acetylsalicylsäure	0,82	1,13

auf die Wundoberfläche meist zu unwesentlichen Unterschieden in den Feuchtgewichten des Granulationsgewebes führten. Nach der i.p. Verabreichung von STAP stellte sich heraus, daß z.T. weniger Granulationsgewebe gebildet wurde. Bei diesen Experimenten erlitten die Tiere die systemisch mit STAP behandelt wurden, einen Körpergewichtsverlust (Durchschnitt -12,5 %), während die Vergleichstiere eine minimale Gewichtsabnahme aufwiesen (Durchschnitt -0,3 %). Diese augenscheinliche Toxizität des Styrylpyrimidins kann möglicherweise die geringeren Wundgewebismengen in einigen behandelten Tieren erklären.

Tabelle 10: Prüfung des Styrylpyrimidins auf anti-entzündliche Wirkung mit Hilfe der Ring-Granulom-Methode (Kontrollwerte in Klammern).

Alter d. Gewebes (Tage)	STAP-Dosierung	Feuchtgewicht ¹⁾ d. Gran. Gewebes (mg)	Gew.d. Ratten	Feuchtgewicht ²⁾ d. Nieren	Tiergew. Verlust, -Zunahme (%)
3	2x150µg, ³⁾ lokal	606±47, n=6 (530±31, n=6) p < 0,15	160- 180g		+ 6,7 (+ 7,5)
5	"	575±65, n=7 (405±47, n=7) p < 0,05	"		+16,2 (+15,4)
7	"	593±41, n=9 (551±63, n=9) p < 0,30	"		+ 8,7 (+ 8,6)
5	2x50 µg, ³⁾ lokal	378±48, n=4 (591±119, n=4) p < 0,10	130- 150g		+14,4 (+25,0)
"	2x100µg, lokal	362±34, n=4 (591±119, n=4) p < 0,10	"		+14,2 "
"	2x150µg, lokal	384±65, n=4 (591±119, n=4) p < 0,10	"		+14,8 "
"	2x200µg, lokal	304±64, n=4 (591±119, n=4) p < 0,05	"		+ 9,5 "
"	2x250µg, lokal	447±69, n=4 (591±119, n=4) p < 0,20	"		+19,8 "
"	2x300µg, lokal	290±44, n=4 (591±119, n=4) p < 0,05	"		+18,3 "
3	6,8mg/ 100g i.p. ⁴⁾	617±68, n=15 (626±44, n=17) p < 0,475	180- 200g	1145±31, n=10 (849±30, n=12) p < 0,0005	-15,3 (-3,5)
5	"	388±34, n=12 (774±39, n=18) p < 0,0005	"	1342±37, n=8 (816±20, n=12) p < 0,0005	-21,3 (-7,0)
7	"	717±46, n=21 (726±46, n=15) p < 0,45	"	1413±40, n=14 (849±34, n=10) p < 0,0005	-13,5 (0)
9	" "	494 , n=6 (695), n=6	"	863±46, n=12 (729±23, n=12) p < 0,01	- 3,5 (+8,3)

(Fortsetzung v. Tab. 10)

Alter d. Gewebes (Tage)	STAP-Dosisierung	Feuchtgewicht ¹⁾ d. Gran. Gewebes (mg)	Gew.d. Ratten	Feuchtgewicht ²⁾ d. Nieren	Tiergew. Verlust, -Zunahme (%)
2	2x1,3mg/ 100g i.p. ⁵⁾	391±40, n=4 (348±27, n=4) p<0,20	150- 170g	783±21, n=8 (464±12, n=8) p<0,005	- 4,6 (+ 5,7)
3	3x1,3mg/ 100g i.p.	399±41, n=3 (516±43, n=4) p<0,10	"	787±47, n=6 (468±13, n=8) p<0,0005	-10,2 (+ 7,2)
4	4x1,3mg/ 100g i.p.	681±101, n=4 (816±109, n=4) p<0,20	"	1612±22, n=8 (721±20, n=8) p<0,0005	-13,0 (- 0,2)
5	5x1,3mg/ 100g i.p.	1003±82, n=4 (1164±39, n=4) p<0,10	"	1402±128, n=8 (753±29, n=8) p<0,0005	- 0,2 (+ 5,4)
6	6x1,3mg/ 100g i.p.	606±43, n=4 (1163±69, n=4) p<0,0005	"	1416±65, n=8 (667± 9, n=8) p<0,0005	-15,5 (+ 5,3)
7	7x1,3mg/ 100g i.p.	909±115, n=5 (1090±60, n=4) p<0,15	"	1236±48, n=10 (762±23, n= 8) p<0,0005	- 4,1 (+ 4,6)

- 1) Mittelwerte werden mit mittleren Fehlern (SEM) angegeben, n = Anzahl der Gewebestückchen, p = Vertrauensbreite nach Student (149).
- 2) Die Gewichte der Nieren der behandelten Tiere sind bedeutend größer gegenüber Nieren von Kontrolltieren.
- 3) Verabreicht direkt auf die Wundfläche in 100 µl gekochtem aqua bidest. jeweils am Tag der Ringeinsetzung und am darauf folgenden Tag. Kontrolltiere wurden lediglich mit gekochtem aqua bidest. behandelt.
- 4) Einmalige Verabreichung in 0,5 ml Erdnußöl am Tag der Ringeinsetzung. Kontrolltiere erhielten vergleichbare Mengen Erdnußöl.
- 5) 1,3 mg STAP in 0,5 ml Erdnußöl am Tag der Ringsetzung und an n darauf folgenden Tagen verabreicht (n= 1,2,3,4,5 oder 6). Kontrolltiere in ähnlicher Weise mit Erdnußöl behandelt.

3.2.3.3. Styrylpyrimidinwirkung auf die Prostaglandinsynthetase in Nierenmarkhomogenaten

Vane (16,17) hat festgestellt, daß die Prostaglandinsynthetase-Systeme von diversen Gewebearten unterschiedliche Empfindlichkeiten für verschiedene "aspirin-like drugs" aufweisen. Beispielsweise wird die Prostaglandinsynthetase aus Hundemilz von Paracetamol nur unwesentlich gehemmt, während das Präparat einen signifikanten Effekt auf das Enzymsystem des Kaninchengehirns aufweist. Da Styrylpyrimidin offensichtlich eine proliferative Wirkung auf die Niere ausübt, lag es nahe, den Effekt dieser Substanz auf das Prostaglandinsynthetase-System der Niere zu prüfen.

Es wurden Homogenate aus Rattennierenmark hergestellt, wie in Teil 2.2.1.3. beschrieben wird. In Abbildung 14 ist eine Kurve aufgezeichnet, die die Abhängigkeit der Prostaglandinausbeute von der Proteinkonzentration im Ansatz wiedergibt. Diese Kurve zeigt ähnliche Charakteristika wie die des RSBM-Systems mit einem linearen Anstieg bei geringeren Enzymkonzentrationen und einem asymptotischen Verlauf bei Ausbeutewerten von ungefähr 50%. Die Ausbeute, die hier berichtet wird, ist etwa dreimal größer als die maximalen Werte, die in der Literatur (59) für Rattennierenmark beschrieben werden (17%). Diese hohen Werte werden nur von Schaf- und Rindersamenblasensystemen erreicht und überschritten. In einer Serie von in vitro Experimenten (Tab. 11) wurde die Wirkung von STAP (1,0 mM) auf Nierenmarksynthetase untersucht, die nach zwei verschiedenen Aufbereitungsverfahren hergestellt wurde. In jedem Versuch wurde eine einheitliche Proteinkonzentration verwendet, die im linearen Anteil des entsprechenden Protein-% Ausbeute-Diagramms lag (siehe Abb. 14), damit die Enzymaktivitäten exakt verglichen werden konnten. Die obere Hälfte der Tabelle stellt Ergebnisse von Versuchen mit wenig aktivem Enzym dar, das in wäßrigem Medium bei 0 °C aufbereitet wurde. Dieses Enzym wurde von 1,0 mM STAP 75%ig gehemmt. Dieser Hemmeffekt des Styrylpyrimidins wird deutlicher (100%), wenn hochaktives Enzym,

das in flüssigem Stickstoff isoliert wurde (untere Hälfte der Tabelle), verwendet wird.

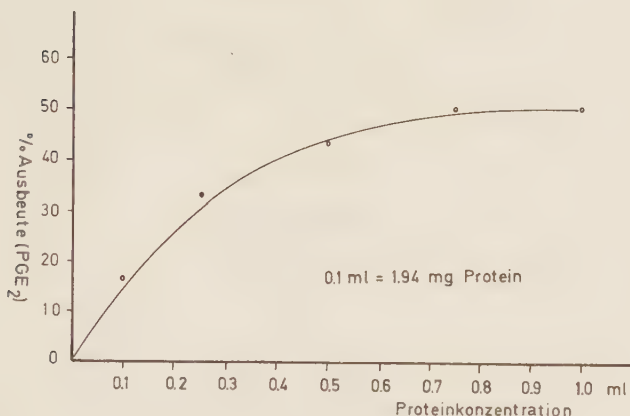


Abbildung 14: Prostaglandinproduktion im Nierenmarkhomogenat aus Ratten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Die Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit von STAP in Nierenmarkhomogenaten aus Ratten wird in Tabelle 12 vorgestellt. Die ID₅₀ von 0,17 mM ist vergleichbar mit der mittleren ID₅₀ von 0,15 mM, die für das RSBM-System gefunden wurde.

Weiterhin wurde indirekt geprüft, ob STAP die Prostaglandinsynthetase der Niere auch in vivo hemmt. Vier Gruppen von jeweils 9-12 Ratten wurden mit einer einmaligen i.p. Dosis von 0,25 mmol STAP/kg Tier vorbehandelt. Die Nierenmedullae wurden 9, 7, 5 und 3 Tage bzw. 14, 9 und 3 Tage nach Verabreichung des Wirkstoffs isoliert und im wäßrigen Medium bei 0-4 °C bzw. in flüssigem Stickstoff aufgearbeitet (Teil 2.2.1.3.). Wie Tabelle 13 zeigt, wiesen die Medullapräpa-

Tabelle 11: In vitro Prostaglandinsynthese in
Nierenmarkhomogenaten von Ratten.

Aufbereit. Methode	Protein- konzentr. (mg/ml)	Testsubstanz	% Ausbeute
wäßrig (0-4 °C)	8,0		2,9
	6,3		3,2
			3,4
			3,2
"	8,0	STAP (1,0mM)	0,8
"	6,3	Indomethacin (2,8mM)	0,0
flüss. N ₂	4,9	-	18,4
			19,4
			20,4
	4,9	STAP (1,0mM)	0,0
	2,5	-	18,0
			18,9
			17,3
"	2,5	STAP (0,1mM)	11,3

tionen von behandelten Tieren eine beträchtlich niedrigere Prostaglandinproduktion auf als das Enzym von Vergleichstieren. Die Hemmung ist besonders gut erkennbar, wenn das Medullagewebe in flüssigem Stickstoff aufbereitet wurde. Wenn STAP außerdem (1,0 mM) in den in vitro Reaktionsansatz zugefügt wurde, konnte eine zusätzliche Inhibition der Prostaglandinsynthetase festgestellt werden.

Schließlich wird aus den Abbildungen 15, 15a ersichtlich, daß die Hemmwirkung von STAP auf das Nierenmarkenzym offenbar bis zu 14 Tagen nach Verabreichung des Pharmakons anhält. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Prostaglandinsynthetasekapazität der Medulla aus behandelten Tieren wieder zuzunehmen.

Tabelle 12: Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit von
Styrylpyrimidin in Nierenmarkhomogenaten.

Konz. an STAP (mM)	% Ausbeute an PGE ₂
0	14,3
0,1	11,1
0,3	1,8
1,0	0,0

Proteinendkonzentration = 4,8 mg/ml.

Enzym in flüssigem Stickstoff aufbereitet.

Werden diese Werte graphisch dargestellt, läßt sich
eine ID₅₀ von 0,17 mM ermitteln.

Tabelle 13: In vitro Prostaglandinsynthese in Nierenmark-homogenaten von Ratten, die in vivo mit STAP vorbehandelt wurden.

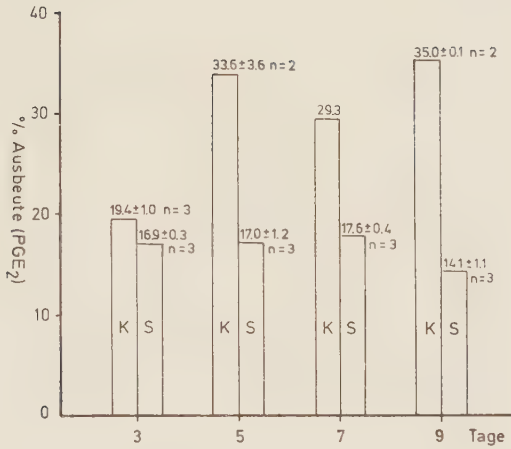
Tag nach ¹⁾ Behandl.	Aufbereit. Methode	Protein- konzentr. (mg/ml)	% Ausbeute (PGE ₂)		Feuchtgew. d. Nieren (g)	
			Kontr.	STAP	Kontr.	STAP
9	wässrig (0-4 °C)	8,0	2,4	1,8	-	-
7	"	"	7,3	1,2	-	-
5	"	"	2,6	2,1	-	-
3	"	"	5,9	1,2	-	-
9	flüss. N ₂	4,9	34,9, 35,0 ²⁾ (0,5)	16,0 14,3 12,1 (0,0)	592±12 ³⁾ n=20 p < 0,0005	941±27 n=29
7	"	"	29,3 (-)	18,3 16,9 17,7 (0,4)	550±8 n=20 p < 0,0005	757±38 n=30
5	"	"	37,2 30,1 (0,0)	19,3 16,0 15,7 (0,0)	540±10 n=20 p < 0,0005	960±46 n=30
3	"	"	18,4 20,4 19,4 (0,0)	16,8 16,5 17,4 (0,0)	579±12 n=30 p < 0,0005	934±37 n=30

1) Behandelten Tieren wurden 9, 7, 5 und 3 Tage vor der Isolierung des Enzyms 6,8 mg STAP/100 g Körpergewicht (0,25 mmol/kg) in Erdnußöl i.p. verabreicht. Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Erdnußöl.

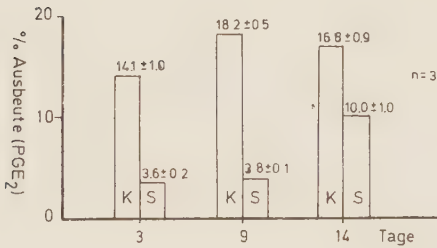
2) Die Werte in Klammern = 1,0 mM STAP im Inkubationsansatz.

3) Mittelwert ± mittlerer Fehler des Mittelwertes.

Die Gewichte der Nieren der behandelten Tiere sind bedeutend größer als die der Nieren von Kontrolltieren. Die Gewichte der Ratten lagen zwischen 170 und 190 g.



K = Kontrolltiere S = mit Styrylpyrimidin behandelte Tiere



Abbildungen 15 und 15a:

Prostaglandinproduktion in Nierenmedullahomogenaten aus Ratten, die in vivo mit Styrylpyrimidin behandelt wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verabreichung des Wirkstoffes.

Mittelwert mit mittlerem Fehler des Mittelwertes.

4. Diskussion

Mit den Rindersamenblasenmikrosomen ist ein Enzymsystem zugänglich gemacht worden, das die Biosynthese von Prostaglandin aus Arachidonsäure in vitro ausführt. Die zuvor beschriebenen Haupteigenschaften des Systems (56,85,87) wurden bestätigt, wie z.B. die Enzymstabilität bei -20°C , die Art des synthetisierten Prostaglandins und die Abhängigkeit der Prostaglandinproduktion sowohl von der Zeit als auch von der Proteinkonzentration. Mit Hilfe dieser Methode kann anhand eines Screening-Verfahrens eine Reihe von Substanzen getestet werden, die die Prostaglandinsynthese beeinflussen könnten. Weiterhin kann die Handhabung dieses Systems als Modell dazu dienen, wie die Syntheseaktivitäten von anderen Geweben bestimmt werden können.

In Rohhomogenaten von Granulationsgewebe konnte mit der beschriebenen Methode keine Prostaglandinsynthese festgestellt werden. Da bei außerordentlich tiefen Temperaturen in flüssigem Stickstoff gearbeitet wurde, erscheint eine Zerstörung dieses temperatur- und möglicherweise sauerstoffempfindlichen Enzyms unwahrscheinlich. Ebenso ist die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus von neu-synthetisierten Prostaglandinen gering, da keine Abbauprodukte nach Inkubation mit $^3\text{H-PGE}_1$ im Rohhomogenat nachweisbar waren. Daraus kann abgeleitet werden, daß die nicht nachweisbare Prostaglandinsynthese in Rohhomogenaten nicht durch unabänderliche Fehler bedingt ist.

Im mikrosomalen Sediment von Granulationsgewebe war eine geringe, aber nachweisbare Prostaglandinsynthese vorhanden, in der Größenordnung von 0,3-0,5 % Ausbeute. Die mikrosomale Fraktion scheint also der Syntheseort auch in diesem Gewebe zu sein (48,53). Es konnten keine Unterschiede in der Synthesekapazität von Granulationsgewebe verschiedenen Alters gefunden werden. Wie die Bestimmungen des Prostaglandingehaltes im Granulationsgewebe mit Hilfe des Radioimmunoassays jedoch zeigten, sind mit zunehmendem Alter abnehmende Mengen von Prostaglandinen im Gewebe vorhanden. Da aber die Enzym-

aktivität des Gewebes so außerordentlich klein ist, können möglicherweise vorhandene geringfügige Unterschiede nicht mehr sicher mit dieser enzymatischen Umsetzungsmethode festgestellt werden.

Es besteht die Möglichkeit, daß das mikrosomale Enzym während der Aufbereitung zu einem gewissen Grad inaktiviert wurde, da es zumindest insgesamt drei Stunden in wäßriger Lösung bei 0-4 °C notwendigerweise zentrifugiert wurde. Andererseits spricht die absolute Abwesenheit von Aktivität im Rohhomogenat, das im flüssigen Stickstoff aufbereitet wurde, dafür, daß die Enzymaktivität in Mikrosomen nicht wesentlich höher sein kann.

Die physiologische Bedeutung dieser geringen Prostaglandinsynthetaseaktivität ist im wesentlichen unbekannt. Anhand der Untersuchungen mit verschiedenen Rattengeweben zeigt sich jedoch, daß die Prostaglandinsyntheserate durch die Art des Gewebes und nicht durch die Tierspezies festgelegt wird. Es erhebt sich somit die Frage, warum einige Gewebe extrem kleine Prostaglandinmengen synthetisieren, während andere Gewebearten die 10- bis 100fache Menge produzieren. Eine plausible Erklärung wäre, daß die Prostaglandine in Organen mit geringer Synthesekapazität ausschließlich als lokale Hormone fungieren, indem sie an Ort und Stelle synthetisiert und abgebaut werden und dadurch auf ihren Wirkungsort beschränkt sind, während die Prostaglandine in anderen Organen mit extrem hoher Synthesekapazität, wie z.B. Samenblasen und Nieren, die Rolle echter Hormone übernehmen, indem sie eine Wirkung auf entfernte Organe ausüben. Letzteres wurde von McGiff (131) für PGA aus der Niere postuliert.

Mit Hilfe des Radioimmunoassays konnten wiederholt Prostaglandine der A, B und E Gruppe in Mengen von ca. 90 ng/g Feuchtgewicht in jungem Granulationsgewebe nachgewiesen werden. Diese Menge an Prostaglandin ist ungefähr 10mal so groß wie die Menge, die in anderen Rattenorganen gefunden wurde (132), 6mal höher als in normaler menschlicher Haut (133) und 180-360mal größer als in einem ml Rattenserum (134). Sie ist

die 100-fache Schwellendosis, die für eine erhöhte Kapillarpermeabilität in Rattenhaut nötig ist (135) und liegt in derselben Größenordnung wie die Menge von PGE_2 , die in einem ml entzündlichen Exsudats von der Ratte gefunden wurde (136). Dies macht deutlich, daß Granulationsgewebe einen über der Norm liegenden Prostaglandingehalt aufweist, der mit dem in akut entzündlichem Gewebe vergleichbar ist. Aus diesem Befund, der neben der Tatsache besteht, daß Granulationsgewebe eine geringe Prostaglandinsynthetasekapazität aufweist, läßt sich folgern, daß in vivo der Prostaglandinabbau bei der chronischen Entzündung verzögert ist oder das Angebot an endogenem Substrat erhöht ist, was durch eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase zu erklären wäre.

Der ständige Abfall des Prostaglandingehaltes während eines Zeitraums von 5 Tagen von ca. 90 auf 50 ng/g Feuchtgewicht zeigt, daß die Menge an Prostaglandin mit zunehmendem Alter des Gewebes die geringeren Werte erreicht, die für nicht-entzündliches, differenziertes Gewebe gefunden werden. Im Hinblick auf Jaffes Befund (31), daß viele Arten von malignen Geweben außerordentlich große Mengen von Prostaglandin erzeugen können, liegt es nahe zu postulieren, daß undifferenziertes, proliferierendes Granulationsgewebe und neoplastisches Gewebe gewisse biochemische Ähnlichkeiten aufweisen.

Es erhebt sich die Frage, ob die Menge an Prostaglandin, die im Granulationsgewebe anwesend ist, durch lokale Prostaglandinproduktion oder aus exogenen Quellen dorthin transportiert wurde. Für letztere Annahme ist ein Anreicherungsmechanismus erforderlich, da die Prostaglandinkonzentration im Rattenserum mit 1,6 ng/ml (eigener Wert) außerordentlich gering ist. Ein derartiger Mechanismus ist bislang nicht beschrieben worden. Andererseits ist eine endogene Prostaglandinsynthese in Granulationsgewebe nachzuweisen, wie aus eigenen Versuchen hervorgeht (siehe Teil 3.1.2.2.). Betrachtet man den Granulationsgewebsverband, dann ist bekannt, daß sowohl vorhandene Leukozyten (30) als auch Fibroblasten (31) in der Lage sind, Prostaglandine zu synthetisieren, während

von anderen Zellkomponenten noch keine Daten vorliegen.

In den Radioimmunoassayversuchen, die ursprünglich eine Aussage darüber liefern sollten, ob die Prostaglandinkonzentration in Granulationsgewebe durch einige Pharmaka beeinflusst werden könnte, waren schlüssige Aussagen nicht zu machen, da erhebliche methodische Fehlerquellen vorhanden waren:

(a) Der Gehalt an Prostaglandin in einem Gewebe zu einem gewissen Zeitpunkt hängt nicht nur von der synthetisierten, sondern auch von der abgebauten Menge ab, so daß Schwankungen im Prostaglandingehalt durch nicht berücksichtigte veränderte Abbauraten entstehen können.

(b) Die Prostaglandinsynthese kann schnell im Gewebe stattfinden, das bei 4 °C aufbereitet wird, was zu einem entscheidenden Anstieg in dem Prostaglandingehalt führen kann (10- bis 20-fach der ursprünglichen Menge (91,132,133)). Es wurde versucht, diese Fehlerquelle weitgehendst auszuschalten, indem das Gewebe sehr schnell aus dem Tier herauspräpariert und nach weniger als einer Minute in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde.

(c) Außerdem kann eine unspezifische Oxidation von Prostaglandin während der Lagerung bei -20 °C stattfinden, obwohl ¹⁴C-PGE₁ sich während Autoxidationsversuchen als stabil erwies (88) und äthanolische Lösungen von PGE₂ mindestens 6 Monate bei -20 °C stabil sind (138).

(d) Mit dem benutzten Radioimmunoassay wurden PGA, B und E gemessen. Außerdem wird nicht zwischen Prostaglandinen mit 1, 2 oder 3 Doppelbindungen in den Seitenketten unterschieden. Es können Fehler durch einige dieser Prostaglandine auftreten, von denen wenig über ihre Funktion und Mengenverteilung bekannt ist.

(e) Am wichtigsten scheint die Fehlerquelle im Radioimmunoassay zu sein, die dadurch entsteht, daß die Prostaglandine während des Extraktionsverfahrens unspezifisch an Albumin (103) und wahrscheinlich an andere Proteine gebunden werden, und

außerdem daß im Bestimmungsansatz die Arachidonsäure (139), sowie andere nicht identifizierte Substanzen die Prostaglandine kompetitiv von ihrer Bindungsstelle verdrängen. Es wurde versucht, diesen Fehler zu umgehen, indem ein weiterer Reinigungsschritt in das Extraktionsverfahren aufgenommen wurde, um lipophile Störsubstanzen zu entfernen. In diesem Schritt wurden 79% der Prostaglandine wiedergefunden, während es jedoch nicht möglich ist, festzustellen, wieviele der störenden Begleitstoffe in dem PG-Extrakt zurückbleiben.

Es ist dennoch als sicher anzusehen, daß die großen Schwankungen durch die oben beschriebenen Fehlerquellen entstanden sind und nicht auf eine fehlerhafte Ausführung der Bestimmung oder auf nicht funktionstüchtige Reagenzien zurückzuführen sind, da alle Standard-PGB-Kurven die korrekte sigmoide Form mit Abweichungen vom Mittelwert aufwiesen, die für die einzelnen Meßpunkte kleiner als 5% waren.

Der ursprüngliche Grund für die Ausführung der pharmakologischen Versuche war, die Wirkung von verschiedenen Substanzen, die die Entzündung und die Zellvermehrung beeinflussen, auf die Synthese und Steady-State-Konzentration von Prostaglandinen in Granulationsgewebe zu prüfen. Es stellte sich aber im Laufe der Untersuchungen heraus, daß die prostaglandinsynthetisierende Aktivität des Granulationsgewebes sehr gering war, so daß Änderungen des Umsatzes von Arachidonsäure in Prostaglandin nicht exakt erfaßt werden konnten. Ferner erwies sich das Radioimmunoverfahren wegen der großen Fehlerbreite lediglich geeignet, Änderungen der Gewebekonzentration von Prostaglandinen zu erfassen, wenn eine große Anzahl von Meßwerten vorhanden war. Da ferner erhebliche methodische Schwierigkeiten in der Handhabung des Gewebes auftraten, wurde auf die Untersuchungen der Wirkung von verschiedenen Substanzen auf die Prostaglandinsynthese und -konzentration in Granulationsgewebe verzichtet, und stattdessen wurden die weiteren pharmakologischen Versuche mit der hochaktiven Prostaglandinsynthetase aus Rindersamenblasenmikrosomen fortgesetzt.

In diesem in vitro System konnte in Versuchen mit LPS aus *Pseudomonas aeruginosa* und diversen Fettsäuren, die in Bakterienzellwänden auftreten, gezeigt werden, daß diese Substanzen selbst in den eingesetzten hohen Konzentrationen die Prostaglandinsynthese nicht beeinflussen und daß damit die in vivo auftretenden Effekte (Teil 3.2.1.) nicht durch direktes Eingreifen von LPS in das Prostaglandinsynthetase-System zustande kommen. Es ist jedoch möglich, daß die LPS in vivo indirekt die Prostaglandinsynthese stimulieren, indem sie beispielsweise die Freisetzung von Phospholipase A aus Lysosomen der Wirtszelle herbeiführen und damit zu einer erhöhten lokalen Konzentration an unveresterter Arachidonsäure führen. Außerdem ist bekannt, daß die LPS selbst nicht als Quelle für Prostaglandinvorstufen dienen können, da Bakterien keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten (140).

Diese Ergebnisse mit RSEM lassen allerdings die Frage offen, ob die LPS möglicherweise die Prostaglandinsynthetase von anderen Geweben (z.B. Blutplättchen, Granulationsgewebe) beeinflussen könnten, da nach der Hypothese von Vane (16,17) verschiedene Gewebe unterschiedlich empfindlich gegen Inhibitoren sind. Außerdem ist ungewiß, ob nur selektive Immuntypen von LPS, die nicht in diesen Versuchen benutzt wurden, eventuell auf den Prostaglandinmetabolismus einwirken, da bekannt ist, daß lediglich LPS aus einigen Stämmen die Wundheilung beschleunigen (98). Letztlich ist es nicht möglich, mit Hilfe dieses Synthetaseansatzes eine Aussage über die Wirkung von LPS auf andere Komponenten des Prostaglandinmetabolismus, z.B. Prostaglandinabbau, zu machen.

Aus der Literatur ist bisher bekannt, daß der Wirkungsmodus der anti-entzündlichen Steroide nicht durch die Prostaglandinsynthetasehemmung erklärt werden kann (112). Die in Teil 3.2.2. geschilderte Inhibition der Prostaglandinsynthese durch eine besondere Gruppe von Steroiden, nämlich 18 β -Glycyrrhetinsäure und deren wasserlösliches Derivat Carbenoxolon, zeigt meines Wissens erstmalig, daß ein Steroid mit anti-entzündlichen Eigenschaften in der Lage ist, die Prostaglandinbiosynthese

in vitro signifikant zu hemmen (112). Die konzentrationsabhängige Hemmung der RSBM-Prostaglandinsynthetase durch 18 β -Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon kann die antiphlogistische Wirkung (113,114) dieser beiden Verbindungen in Tierversuchen erklären, vorausgesetzt, daß nach systemischer Behandlung die Konzentration der beiden Substanzen im Blut ausreichend hoch ist. Die Tatsache, daß 18 β -Glycyrrhetinsäure ein stärkerer Enzyminhibitor, aber ein schwächeres Antiphlogistikum als Carbenoxolon ist, ist möglicherweise auf die geringere Wasserlöslichkeit von 18 β -Glycyrrhetinsäure zurückzuführen, die in den zitierten Untersuchungen s.c. oder i.m. verabreicht wurde und wahrscheinlich von der Injektionsstelle nicht vollständig resorbiert wurde.

Um die durch Carbenoxolon hervorgerufenen antikoagulierenden Effekte, wie sie von Finney et al. (114) beschrieben wurden, herbeizuführen, sind Konzentrationen von mindestens 5 mg/ml (8,1 mM) erforderlich. Aus Abbildung 10 ist zu ersehen, daß bei dieser Konzentration die RSBM-Prostaglandinsynthese fast 100%ig gehemmt wird. Ebenso wie die "aspirin-like drugs", die sowohl antikoagulierende Eigenschaften aufweisen als auch Prostaglandinsynthese-Hemmstoffe sind, scheinen diese beiden anti-entzündlichen Steroide über den gleichen Mechanismus zu wirken. Daß Carbenoxolon-Natrium in Menschen keine allgemeine anti-entzündliche oder antikoagulierende Wirkung zeigt (141), ist wahrscheinlich auf den niedrigen therapeutischen Plasmaspiegel von 10-100 μ g/ml und auch auf die hohe Plasmaproteinbindung (99%) der Substanz zurückzuführen (116).

Andere klinische Effekte von Carbenoxolon und 18 β -Glycyrrhetinsäure, wie die heilende Wirkung auf Magenulcera (115,116), können nicht durch die Prostaglandinsynthesehemmung erklärt werden¹, da die Prostaglandine auf die Magenschleimhaut eine Schutzwirkung ausüben, indem sie die Magensaftsekretion ver-

Anmerkung 1: Neuere Untersuchungen von Amer (142) erklären möglicherweise den biochemischen Wirkungsmechanismus von 18 β -Glycyrrhetinsäure. Dieses Pharmakon inhibiert vermutlich die Magensaftsekretion, indem es selektiv die cAMP-Phosphodiesterase der Magenfundusschleimhaut hemmt, was zu einem intrazellulären Anstieg des cAMP/cGMP-Verhältnisses führt.

mindern (117,118), und da andererseits Pharmaka, wie z.B. Aspirin, die die Prostaglandinbiosynthese hemmen, zu Magenschleimhautulcerationen führen (117). Die üblichen therapeutischen Dosen von Carbenoxolon (ungefähr 300 mg/Tag (116)) ergeben lokal sehr hohe Konzentrationen im Magensaft in der Größenordnung von 3 mM^2 . Bei dieser Konzentration wäre die Prostaglandinsynthetase etwa 90%ig gehemmt. 18 β -Glycyrrhetinsäure, die eine geringere antiulcerogene Wirkung hat, würde sogar bei niedrigeren Konzentrationen die Prostaglandinsynthese inhibieren (Abb. 10). Eine gute antiulcerogene Wirkung scheint verbunden zu sein mit einer geringeren Prostaglandinsynthesehemmung. Dieser Befund könnte als Richtlinie zur Entwicklung von wirksameren antiulcerogenen Therapeutika dienen, indem versucht wird, die Prostaglandinsynthesehemmung von der spezifischen cAMP-Phosphodiesterhemmung zu dissoziieren.

Die RSEM-Synthetase wurde durch STAP gehemmt, während strukturanaloge Substanzen keine Hemmung zeigten, außer Stilbazol, das sehr wirksam war. Selbst alle anderen Substanzen, die eine Zellproliferation in der Niere auslösen und die in dem Prostaglandinsynthetaseansatz untersucht wurden, zeigten keine Hemmwirkung, so daß die nierenvergrößernden Eigenschaften des Styrylpyrimidins nicht unmittelbar durch eine direkte Prostaglandinsynthetasehemmwirkung erklärt werden können. Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, daß Styrylpyrimidin in vivo entweder selektiv oder in unspezifischer Weise auf das Enzymsystem der Niere wirkt.

Styrylpyrimidin und Stilbazol (Abb. 16) zeichnen sich durch eine andersartige chemische Struktur unter der großen Anzahl der z.Zt. bekannten Prostaglandinsyntheseinhibitoren aus (144). Der auffälligste Unterschied ist das Fehlen einer Carboxylgruppe, die in der Mehrzahl der "aspirin-like drugs" auftritt (Abb. 16). Daß die Synthetase durch unterschiedliche

Anmerkung 2: Bei einer Magensaftbasalsekretion von 30-70 ml/hr (143) wird angenommen, daß 50 ml Saft durchschnittlich im Magen vorhanden sind. Bei einer Einzeldosierung von 100 mg Carbenoxolon ergibt sich eine Konzentration von ca. $3,0 \text{ mM}$.

chemische Substanzgruppen (wie z.B. Steroide, stickstoffhaltige Heterocyclusen, aromatische Carboxylsäuren; siehe auch Literaturangabe (144)) gehemmt wird, deutet darauf hin, daß das Enzym mehrere Bindungsstellen aufweist, deren Besetzung durch Pharmaka zu Aktivitätsverlust führt.

STAP zeigte bei lokaler und systemischer Applikation, trotz seines guten Hemmeffekts auf die Prostaglandinsynthetase, keine anti-entzündlichen Eigenschaften. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der oft bestätigten Hypothese von Vane (16), daß die "aspirin-like drugs" beide Charakteristika aufweisen. Dieser Widerspruch kann durch die geringe Wasserlöslichkeit des Styrylpyrimidins unter physiologischen und sauren pH-Werten (124) erklärt werden, was zu einer unzureichenden Verteilung im Organismus bzw. einer Anhäufung des Wirkstoffs in dem sauren Milieu der Niere führen kann (124). Möglicherweise könnten Derivate des Styrylpyrimidins, die durch die Addition einer Carboxylgruppe wasserlöslicher gemacht werden, bessere antiphlogistische Eigenschaften aufweisen. Diese Annahme wird durch die hohe antiphlogistische und prostaglandinsynthetasehemmende Wirkung der Fenamsäure (144) unterstützt (siehe Abb. 16).

Wie zuvor erwähnt, ist es nicht möglich, mit Hilfe des RSBM-Systems aufzuzeigen, ob Styrylpyrimidin in vivo eine spezifische Hemmung der Prostaglandinsynthetase der Niere verursacht oder ob STAP zu einer unselektiven Schädigung des gesamten Nierenmarks führt. Aus diesem Grunde wurden zwei Serien von Versuchen unternommen: Erstens in vitro Experimente mit dem Prostaglandinsynthetase-System der Niere, um eine gewebsspezifische Wirkung von STAP zu untersuchen, und zweitens in vivo Experimente, die Aufschluß über eine unspezifische Inaktivierung des Nierenenzyms geben sollten.

Überraschend hohe Ausbeuten an Prostaglandin in Nierenmark-homogenaten aus Ratten ermöglichten die Anwendung der Prostaglandinsynthetase-Methode zur Untersuchung dieser Fragen. Umsätze von ca. 50%, die in Nierenrohhomogenaten gefunden wurden, konnten nur erzielt werden, wenn das Gewebe in flüssigem

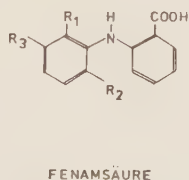
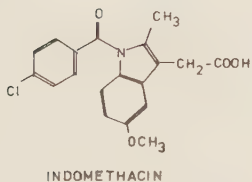
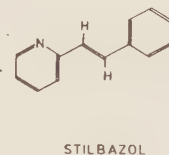
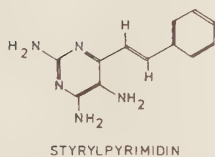
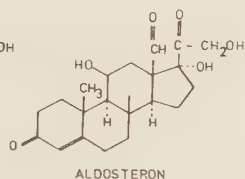
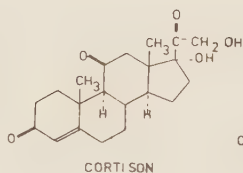
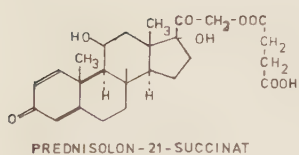
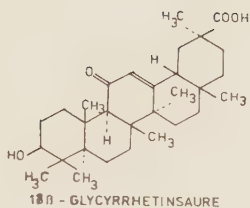
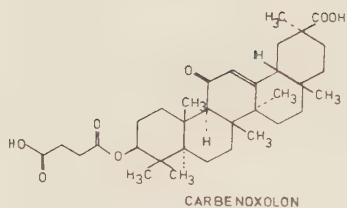


Abbildung 16: Chemische Formeln von Antiphlogistika
und/oder Prostaglandinsynthetase-
Inhibitoren.

Stickstoff aufbereitet wurde, während konventionelle Aufbereitungsverfahren bei 0-4 °C nur mäßige Ausbeuten lieferten. Dieser Befund zeigt, daß das Nierenenzym leichter geschädigt werden kann als das RSBM-System.

Mit Hilfe dieser hochaktiven Nierenenzympräparation sind exaktere Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand des Enzyms in vivo als mit einem teilweise inaktivierten System zu ziehen. Es zeigte sich, daß selbst dieses hochaktive Nierenenzym nicht empfindlicher als das RSBM-System auf das STAP in vitro anspricht. Obwohl das Nierenenzym keine außergewöhnliche Empfindlichkeit gegenüber STAP in vitro zeigt, weisen Tiere, die einmal mit dieser Substanz behandelt wurden, eine erniedrigte Prostaglandinsynthese im Nierenmark auf. Diese Wirkung dauert bis zu 14 Tagen an.

Bislang sind keine Untersuchungen in der Literatur über die Eliminierung von STAP aus dem Organismus bekannt. Mit Hilfe von Lichtmikroskopie (124) konnte gezeigt werden, daß STAP für längere Zeiträume in den Nierentubuli verweilt. Da zugleich die Prostaglandinsynthetase in den Interstitiellen Zellen der Papille und in den Zellen der Sammelröhrchen des Nierenmarks (145) lokalisiert ist, ist eine direkte pharmakologische Hemmung des Enzyms möglich. Andererseits kann die andauernde Reduktion der Prostaglandinsynthese dadurch erklärt werden, daß STAP das Nierenmark und damit die Prostaglandinsynthetase unspezifisch schädigt. Falls die letztere Erklärung zutrifft, müßten nierenvergrößernde, nicht-synthetasehemmende Substanzen ebenfalls einen in vivo Aktivierungsverlust zeigen. Letztlich besteht hypothetisch die Möglichkeit, daß Styrylpyrimidin die Regeneration der Prostaglandinsynthetase blockiert. Allerdings konnte in Versuchen von Blackwell und Flower gezeigt werden, daß das Cycloheximid, ein starker Inhibitor der Proteinbiosynthese, die prostaglandinsynthetisierende Kapazität in der Ratteniere nicht vermindert (146).

Da STAP in der Niere eine bedeutsame und zugleich andauernde Wirkung zeigt, kann diese Substanz als Hilfsmittel bei

der Untersuchung über die Funktion der Prostaglandine in der Nierenregeneration und zur Klärung der Autoregulation der Niere nützlich sein. Wegen der hohen Prostaglandinausbeuten ist es gleichzeitig möglich durch die Anwendung dieser Methode, Aussagen zu erhalten über die Enzymaktivität eines Systems, das verschiedenen pharmakologischen Einflüssen in vivo ausgesetzt war.

5. Zusammenfassung

Die prostaglandinsynthetisierende Kapazität von Granulationsgewebe ist in Rohhomogenaten und in mikrosomalen Präparationen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen bestimmt worden, indem die Bildung von Prostaglandin aus zugefügter radioaktiver Arachidonsäure gemessen wurde. In Rohhomogenaten von Granulationsgewebe konnte keine Prostaglandinsynthese nachgewiesen werden, während jedoch in der Mikrosomenfraktion eine außerordentlich geringe Ausbeute, in der Größenordnung von 0,3-0,5 %, gefunden wurde. Diese minimale Ausbeute war sogar niedriger als die anderer Rattengewebe, was als Charakteristikum des Gewebes selbst und nicht der Tierspezies zu deuten ist.

Radioimmunologische Bestimmungen der Gesamtmenge an Prostaglandinen der A, B und E Gruppen zeigten, daß Granulationsgewebe nicht unbeträchtliche Mengen an Prostaglandin enthält (ca. 90 ng/g Feuchtgewicht) und daß die Menge in älterem Granulationsgewebe absinkt. Obwohl diese Methode sehr empfindlich ist und sogar Picogramm-Mengen von Prostaglandinen in einer Standardlösung erfaßt, erwies sie sich als zu unspezifisch zur Bestimmung von Prostaglandinen aus Gewebsextrakten, obgleich ein weiterer Reinigungsschritt in das Aufarbeitungsverfahren aufgenommen wurde. Demzufolge lieferten die Untersuchungen, die eine Aussage über die Wirkung von Pharmaka auf den Prostaglandingehalt in Granulationsgewebe machen sollten, keine schlüssigen Ergebnisse. Mit Hilfe eines hochaktiven Prostaglandinsynthetase-Systems

(Rindersamenblasenmikrosomen) wurde die Wirkung von drei Substanzgruppen, die den Entzündungsablauf und die Zellvermehrung beeinflussen, auf die Prostaglandinbiosynthese in vitro untersucht.

Lipopolysaccharide aus *Pseudomonas aeruginosa*, die bekannterweise den Wundheilungsvorgang beschleunigen, und mehrere Fettsäuren aus den LPS hatten keinen Einfluß auf die Prostaglandinsynthetase.

Die beiden antiphlogistischen Steroide, 18 β -Glycyrrhetinsäure und deren Hemisuccinat Carbenoxolon, hemmten selektiv und konzentrationsabhängig die Prostaglandinsynthetase aus Rindersamenblasen. Die inhibitorischen Konzentrationen (50%) liegen für 18 β -Glycyrrhetinsäure bei 0,55 mM und für Carbenoxolon bei 0,89 mM. Diese Werte zeigen, daß die Steroide stärkere Prostaglandinsynthetaseinhibitoren als Acetylsalicylsäure sind ($ID_{50} = 1,13$ mM). Dieser Hemmeffekt steht im Einklang mit ihren antiphlogistischen und antikoagulierenden Eigenschaften, erklärt aber nicht ihre antiulcerogene Wirkung. Letztere wird wahrscheinlich durch die Prostaglandinsynthesehemmung sogar eingeschränkt.

2,4,5-Triamino-6-styrylpyrimidin, eine Substanz, die die Zellproliferation in der Niere hervorruft, hemmte das Rindersamenblasenmikrosomen-Enzym 10mal stärker als Acetylsalicylsäure, ebenso zeigte 2-Styrylpyridin (Stilbazol), das dem Styrylpyrimidin strukturell ähnlich ist, bei einer Konzentration von 1 mM eine 97%ige Hemmung des RSBM-Enzymsystems. Jedoch wiesen andere Verbindungen, die eine regenerative Nierenvergrößerung verursachen, keinen Effekt auf. Dieser Befund deutet an, daß kein unmittelbarer Zusammenhang besteht zwischen den nierenvergrößernden Charakteristika dieser Substanzen und ihrer Fähigkeit, die Prostaglandinsynthese zu hemmen.

Trotz der relativ hohen Hemmwirkung des Styrylpyrimidins konnten keine anti-entzündlichen Eigenschaften mit Hilfe der

Ring-Granulom-Methode festgestellt werden.

Außerdem hemmte Styrylpyrimidin die hochaktive Prostaglandinsynthetase aus Rattennierenmedulla bei gleichen Konzentrationen ($ID_{50} = 0,17 \text{ mM}$) wie im RSBM-System. Dies bedeutet, daß das Nierenenzymssystem nicht empfindlicher auf das Styrylpyrimidin reagiert. In vivo konnte durch die einmalige Verabreichung von $0,25 \text{ mMol STAP/kg}$ eine Verminderung der Prostaglandinsyntheseaktivität herbeigeführt werden, die 14 Tage lang andauerte.

Literaturverzeichnis

- (1) Vane, J.R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nature New Biology* 231, 232-235 (1971).
- (2) Ferreira, S.H., Moncada, S., und Vane, J.R., Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from spleen, *Nature New Biology* 231, 237-239 (1971).
- (3) Smith, J.B., und Willis, A.L., Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets, *Nature New Biology* 231, 235-237 (1971).
- (4) Wilhelm, D.L., Chemical mediators, in: *The Inflammatory Process*, Band II, Hrsg.: Zweifach, B.W., Grant, L., McCluskey, R.T., Academic Press, New York und London, 1973, S.251-301.
- (5) Solomon, L.M., Juhlin, L., Kirschbaum, M.B., Prostaglandin on cutaneous vasculature, *J.invest.Derm.* 51, 280-282 (1968).
- (6) Juhlin, S., und Michealsson, G., Cutaneous vascular reactions to prostaglandins in healthy subjects and in patients with urticaria and atopic dermatitis, *Acta dermat.-vener. (Stockholm)* 49, 251-261 (1969).
- (7) Arora, S., Lahiri, P.K., und Sanyal, R.K., The role of prostaglandin E₁ in the inflammatory process in the rat, *Int.Arch.Allergy appl.Immunol.* 39, 186-191 (1970).
- (8) Glenn, E.M., Bowman, B.J., und Rohloff, N.A., Pro-inflammatory effects of certain prostaglandins, in: *Prostaglandins in Cellular Biology*, Band I, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Pharriss, B.B., Plenum Press, New York und London, 1972, S.329-343.
- (9) Lewis, A.J., Wells, P.W., und Eyre, P., Cutaneous reaction to prostaglandins E₁, E₂, and F_{2α} in the bovine, *J.Pharm.Pharmacol.* 24, 326-328 (1972).
- (10) Kaley, G., und Weiner, R., Effect of prostaglandin E₁ on leucocyte migration, *Nature New Biol.* 234, 114-115 (1971).
- (11) Willis, A.L., Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion, *J.Pharm.Pharmacol.* 21, 126-128 (1969).
- (12) Willis, A.L., Davison, P., Ramwell, P.W., Brocklahurst, W.E., und Smith, B., Release and actions of prostaglandins in inflammation and fever: inhibition by anti-inflammatory and antipyretic drugs, in: *Prostaglandins in Cellular Biology*, Band I, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Pharriss, B.B., Plenum Press, New York und London, 1972, S.227-259.
- (13) DiRosa, M. Giroud, J.P., und Willoughby, D.A., Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine, *J.Pathol.* 104, 15-29 (1971).

- (14) Vane, J.R., Prostaglandins in the inflammatory response, in: *Inflammation: Mechanism and Control*, Hrsg.: Lepow, I.H., und Ward, P.A., Academic Press, New York und London, 1972, S.261-273.
- (15) Vane, J.R., Prostaglandins and aspirin-like drugs, in: *Pharmacology and the Future of Man*, Proc. 5th Int. Congr. Pharmacol. San Francisco, 1972, Band V, Karger, Basel, 1973, S.352-378.
- (16) Vane, J.R., Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of action of aspirin-like drugs, *Adv. Biosci.* 9, 395-411 (1972).
- (17) Vane, J.R., Prostaglandins and the aspirin-like drugs, *Hosp.Pract.* 7, 61-71 (1972).
- (18) Collier, H.O.J., Prostaglandins and aspirin, *Nature* 232, 17-19 (1971).
- (19) Dumont, A.E., Fibroplasia: a sequel to lymphocyte Exudation, in: *The Inflammatory Process*, Band III, Hrsg.: Zweifach, B.W., Grant, L., McCluskey, R.T., Academic Press, New York und London, 1973, S.443-466.
- (20) Robbins, S.L., Pathology, 3. Aufl., W.B. Saunders, Co., Philadelphia und London, S.53.
- (21) Hamperl, H., Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie, 28. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968, S.188-190.
- (22) Goodman, L.S., und Gilman, A., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4. Aufl., The MacMillan Co., New York, 1970, S.321-322, 336, 338.
- (23) Rudas, B., Zur quantitativen Bestimmung von Granulationsgewebe in experimentell erzeugten Wunden, *Arzneim.-Forsch.* 10, 226-229 (1960).
- (24) Fukuhara, M., Tsurufuji, S., Effect of locally injected anti-inflammatory drugs on the carrageenin granuloma in rats, *Biochem.Pharmacol.* 18, 475-484 (1969).
- (25) Movat, H.Z., The acute inflammatory reaction, in: *Inflammation, Immunity, and Hypersensitivity*, Hrsg.: Movat, H.Z., Harper und Row, New York, 1971, S.1-129.
- (26) Anderson, A.J., Brocklehurst, W.E., und Willis, A.L., Evidence for the role of lysosomes in the formation of prostaglandins during carrageenin induced inflammation in the rat, *Pharmacol.Res.Comm.* 3, 13-19 (1971).
- (27) Munder, P.G., Ferber, E., und Fischer, H., Lysophosphatide und Entzündung, in: *Die Entzündung. Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung*, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 1966, S.158-167.
- (28) Samuelsson, B., Biosynthesis and metabolism of prostaglandins, in: *Proceedings of the Fourth International Congress on Pharmacology*, Band IV, Basel, 1969, Schwabe & Co., Basel-Stuttgart, S.12-31.

- (29) Kunze, H., und Vogt, W., Significance of phospholipase A for prostaglandin formation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 123-125 (1971).
- (30) Higgs, G.A., und Youlton, L.J.F., Prostaglandin by rabbit peritoneal polymorphonuclear leucocytes in vitro, *Br.J.Pharmacol.* 44, 330P (1972).
- (31) Jaffe, B.M., Parker, C.W., und Philpott, G.W., Prostaglandin release by human cells in vitro, in: *Prostaglandins in Cellular Biology*, Band I, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Pharriss, B.B., Plenum Press, New York und London, 1972, S.207-219.
- (32) Søndergaard, J., und Wolf-J rgensen, P., The cellular exudate of cutaneous inflammation induced by prostaglandins E₁ and F_{1 }, *Acta Dermatovener. (Stockholm)* 52, 361-364 (1972).
- (33) Søndergaard, J., Helin, P., und J rgensen, H.P., Human cutaneous inflammation induced by prostaglandin E₁, *J.Path.* 109, 239-243 (1973).
- (34) Kischer, C.W., Accelerated maturation of chick embryo skin treated with a prostaglandin (PGB₁): An electron microscopic study, *Am.J.Anat.* 124, 491-512 (1969).
- (35) Blumenkrantz, N., und Søndergaard, J., Effect of prostaglandins E₁ and F_{1 } on biosynthesis of collagen, *Nature New Biol.* 239, 246 (1972).
- (36) Kischer, C.W., Effects of specific prostaglandins on development of chick embryo skin and down feather organ in vitro, *Develop.Biol.* 16, 203-215 (1967).
- (37) Hammarström, S. Samuelsson, B., und Bjursell, G., Prostaglandin levels in normal and transformed baby-hamster-kidney fibroblasts, *Nature New Biol.* 243, 50-51 (1973).
- (38) Whitfield, J.F., MacManus, J.P., Braceland, B.M., und Gillan, D.J., The influence of calcium on the cyclic-AMP-mediated stimulation of DNA synthesis and cell proliferation by prostaglandin E₁, *J.Cell.Physiol.* 79, 353-362 (1972).
- (39) Whitfield, J.F., MacManus, J.P., Braceland, B., und Gillan, D.J., Inhibition by calcium of the cyclic-AMP-mediated stimulation of thymic lymphoblast proliferation by prostaglandin E₁, *Horm.Metab.Res.* 4, 304-308 (1972).
- (40) Johnson, G.S., und Pastan, I., Change in the growth and morphology of fibroblasts by prostaglandins, *J.Nat Cancer Inst.* 47, 1357-1364 (1971).
- (41) Bergström, S., Carlson, L.A., und Weeks, J.R., The prostaglandins: a family of biologically active lipids, *Pharmac. Rev.* 20, 1-48 (1968).
- (42) Hinman, J.W., Prostaglandins, *Ann.Rev.Biochem.* 41, 161-178 (1972).
- (43) Horton, E.W., Hypotheses on physiological roles of prostaglandins, *Physiol.Rev.* 49, 122-161 (1969).

- (44) Ramwell, P.W., und Shaw, J.E., Biological significance of the prostaglandins, *Rec.Progr.Horm.Res.* 26, 139-187 (1970).
- (45) Weeks, J.R., Prostaglandins, *Ann.Rev.Pharmacol.* 12, 317-336 (1972).
- (46) Jones, R.L., Cammock, S., Purification, properties, and biological significance of prostaglandin A isomerase, *Adv.Biosci.* 9, 61-70 (1973).
- (47) Bergström, S., Danielsson, H., und Samuelsson, B., The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid, *Biochim.biophys. Acta* 90, 207-210 (1964).
- (48) van Dorp, D.A., Beerthuis, R.K., Nugteren, D.H., und Vonkeman, H., The biosynthesis of prostaglandins, *Biochim. biophys. Acta* 90, 204-207 (1964).
- (49) Takeguchi, C., Kohne, E., und Sih, C.J., Mechanism of prostaglandin biosynthesis. I. Characterization and assay of bovine prostaglandin synthetase, *Biochem.* 10, 2372-2376 (1971).
- (50) Christ, E.J., und van Dorp, D.A., Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues, *Biochim. biophys. Acta* 270, 537-545 (1972).
- (51) Samuelsson, B., Biosynthesis and metabolism of prostaglandins, *Progr.biochem.Pharmacol.* 3, 59-70 (1967).
- (52) Wallach, D.P., The enzymic conversion of arachidonic acid to prostaglandin E₂ with acetone powder preparations of bovine seminal vesicles, *Life Sci.* 4, 361-364 (1965).
- (53) Christ, E.J., und Nugteren, D.H., The biosynthesis and possible function of prostaglandins in adipose tissue, *Biochim. biophys. Acta* 218, 296-307 (1970).
- (54) Ziboh, V.A., McElligott, T., und Hsia, S.L., Prostaglandin E₂ biosynthesis in human skin: Subcellular location and inhibition by unsaturated fatty acids and antiinflammatory agents, *Adv.Biosci.* 9, 457-460 (1973).
- (55) Lands, W.E.M., LeTellier, P.R., Rome, L.H., und Vanderhoek, J.Y., Inhibition of prostaglandin biosynthesis, *Adv. Biosci.* 9, 15-28 (1973).
- (56) Wallach, D.P., und Daniels, E.G., Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from sheep seminal vesicles, *Biochim.biophys.Acta* 231, 445-457 (1971).
- (57) Maddox, I.S., The role of copper in prostaglandin synthesis, *Biochim.biophys.Acta* 306, 74-81 (1973).
- (58) Flower, R.J., Cheung, H.S., und Cushman, D.W., Quantitative determination of prostaglandins and malondialdehyde formed by the arachidonate oxygenase (prostaglandin synthetase) system of bovine seminal vesicle, *Prostaglandins* 4, 325-341 (1973).
- (59) Christ, E.J., und van Dorp, D.A., Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Adv. Biosci.* 9, 35-38 (1973).

- (60) Tan, W.C., und Privett, O.S., Analysis of prostaglandins in rat vesicular glands, *Lipids* 7, 622-624 (1972).
- (61) van Dorp, D.A., Aspects of the biosynthesis of prostaglandins, *Progr.biochem.Pharmacol.* 3, 71-82 (1967).
- (62) Nugteren, D.H., Beerthuis, R.K., und van Dorp, D.A., The enzymic conversion of all-cis-8,11,14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E₁, *Recueil Trav. Chim. Pays-Bas* 85, 405-419 (1966).
- (63) Lands, W.E.M., Lee, R.E., und Smith, W.L., Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins, *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 180, 107-122 (1971).
- (64) Lee, R.E., und Lands, W.E.M., Cofactors in the biosynthesis of prostaglandins E and F, *Biochim. biophys. Acta* 260, 203-211 (1972).
- (65) Samuelsson, B., Biosynthesis of prostaglandins, *Progr. biochem.Pharmacol.* 2, 109-128 (1969).
- (66) Smith, W.L., und Lands, W.E.M., Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis, *J.biol.Chem.* 246, 6700-6702 (1971).
- (67) Änggård, E., Studies on the analysis and metabolism of the prostaglandins, *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 180, 200-217 (1971).
- (68) van Dorp, D.A., Recent developments in the biosynthesis and the analyses of prostaglandins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 181-199 (1971).
- (69) Änggård, E., Chairman's report of the discussion, in: *Proc. 4th Int.Congr. Pharmacol.*, Basel, 1969, Band IV, Schwabe & Co., Basel-Stuttgart, S.54-61.
- (70) Samuelsson, B., Biosynthesis and metabolism of prostaglandins, in: *Proc. 4th Int.Congr. Pharmacol.*, Band IV, Basel, 1969, Schwabe & Co., Basel-Stuttgart, S.12-31.
- (71) Lands, W.E.M., und Samuelsson, B., Phospholipid precursors of prostaglandins, *Biochim.biophys.Acta* 164, 426-429 (1968).
- (72) Kunze, H., und Vogt, W., Significance of phospholipase A for prostaglandin formation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 123-125 (1971).
- (73) Morgan, T.E., Tinker, T.O., und Hanahan, D.J., *Arch. Biochem.Biophys.* 103, 54- (1963).
- (74) Crowshaw, K., Prostaglandin biosynthesis from endogenous precursors in rabbit kidney, *Nature New Biology* 231, 240-242 (1971).
- (75) Moore, J.H., und Williams, D.L., Dietary linoleic acid and the accumulation of homo- α -linoleic acid in cholesterol esters of the adrenal gland of the rabbit. *Biochim.biophys.Acta* 116, 181-183 (1966).

- (76) Ramwell, P.W., Shaw, J.E., Douglas, W.W., und Poisner, A.M., Efflux of prostaglandin from adrenal glands stimulated with acetylcholine, *Nature* 210, 273-274 (1966).
- (77) Horton, E.W., Jones, R., Thompson, C., und Poyser, N., Release of prostaglandins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 351-362 (1971).
- (78) Änggård, E., und Samuelsson, B., A prostaglandin dehydrogenase from pig lung, *Meth.Enzym.* 14, 215-219 (1969).
- (79) Samuelsson, B., Granström, E., und Green, K., Metabolism of prostaglandins, *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 180, 138-163 (1971).
- (80) Änggård, E., und Samuelsson, B., The metabolism of prostaglandins in lung tissue, in: Nobel Symposium 2. Prostaglandins, Hrsg.: Bergström, S., und Samuelsson, B., Almqvist & Wiskell, Stockholm, 1967, S.97-105.
- (81) Hamburg, M., und Samuelsson, B., On the metabolism of prostaglandins E₁ und E₂ in man, *J.biol.Chem.* 246, 6713-6721 (1971).
- (82) Änggård, E., Bohman, S.O., Griffin, J.E., Larsson, C., und Maunsbach, A.B., Subcellular localisation of the prostaglandin system in the rabbit renal papilla, *Acta Physiol. Scand.* 84, 231-246 (1972).
- (83) Piper, P.J., Distribution and metabolism, in: The Prostaglandins. Pharmacological and Therapeutic Advances, Hrsg.: Cuthbert, M.F., William Heinemann Medical Books Ltd., London, 1973, S.125-150.
- (84) Sih, C.J., Takeguchi, C., und Foss, P., Mechanism of prostaglandin biosynthesis. III. Catecholamines and serotonin as coenzymes, *J.Am.Chem.Soc.* 92, 6670 (1970).
- (85) Tomlinson, R.V., Ringold, H.J., Qureshi, M.C., und Forchielli, E., Relationship between inhibition of prostaglandin synthesis and drug efficacy. Support for the current theory on mode of action of aspirin-like drugs, *Biochem.biophys.Res.Comm.* 46, 552-559 (1972).
- (86) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J.Biochem.Chem.* 193, 265 (1951).
- (87) Yoshimoto, A., Ito, H., und Tomita, K., Cofactor requirements of the enzyme synthesizing prostaglandin in bovine seminal vesicles, *J.Biochem.* 68, 487-499 (1970).
- (88) Nugteren, D.H., Vonkeman, H., und van Dorp, D.A., Non-enzymic conversion of all-cis-8,11,14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E₁, *Recueil Trav.Chim. Pays-Bas* 86, 1237-1245 (1967).
- (89) Horton, E.W., und Thompson, C.J., Thin layer chromatography and bioassay of prostaglandins in extracts of semen and tissues of the male reproductive tract, *Br.J. Pharmac.* 22, 183-188 (1964).
- (90) Green, K., und Samuelsson, B., Thin-layer chromatography of the prostaglandins, *J.Lipid Res.* 5, 117-120 (1964).

- (91) Shaw, J.E., und Ramwell, P.W., Separation, identification, and estimation of prostaglandins, *Meth.biochem.Anal.* 17, 325-371 (1969).
- (92) Levine, L., Gutierrez-Cernosek, R.M., und Van Vunahis, H., Specificities of prostaglandins B₁, F_{1α}, and F_{2α} antigen-antibody reactions, *J.biol.Chem.* 246, 6782-6785 (1971).
- (93) Hickler, R.B., The identification and measurement of prostaglandin in human plasma, in: *Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation for Exp. Biol.*, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Shaw, J.E., Interscience, N.Y., 1968, S.279-293.
- (94) Granström, E., Lands, W.E.M., und Samuelsson, B., Biosynthesis of 9α,15-dihydroxy-11-keto-prost-13-enoic acid, *J.biol.Chem.* 243, 4104-4108 (1968).
- (95) Wolfe, L.S., Coceani, F., und Pace-Asciak, C., Brain prostaglandins and studies of the action of prostaglandins on the isolated rat stomach, in: *Prostaglandins, Proc. 2nd Nobel Symposium, Stockholm, 1966*, Hrsg.: Bergström, S., und Samuelsson, B., Almquist & Wiskell, Stockholm, 1967, S.263-275.
- (96) Meier, R., DeSaulles, P.A., Schär, B., Verschiedenartiger Wirkungstypus bakterieller "entzündungserregender" Substanzen und anderer Reizstoffe, *Naunyn-Schm.Arch.exp.Path.Pharmakol.* 224, 104-122 (1955).
- (97) Freihoffer, U., Robinson, E.A., Jackson, D.S., und Dunphy, J.E., The effect of bacterial endotoxin on connective tissue growth and wound tensile strength, *Surg.Forum* 11, 293-295 (1960).
- (98) Rudolph, R., Über die Beeinflussung der Wundheilungsvorgänge durch ein Lipopolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa*, Inauguraldissertation an der Med.Fak. der Freien Universität Berlin, 1970.
- (99) Milner, K.C., Rudbach, J.A., und Ribí, I., in: *Microbial Toxins, Band IV*, Hrsg.: Weinbaum, G., Kadis, S., und Ajl, S.J., Academic Press, New York und London, 1971, S.18.
- (100) Skarnes, R.C., und Harper, M.J.K., Relationship between endo-toxin induced abortion and the synthesis of prostaglandin F, *Prostaglandins* 1, 191-203 (1972).
- (101) Milton, A.S., Prostaglandin E₁ and endotoxin fever, and the effects of aspirin, indomethacin, and 4-acetamidophenol, *Adv.Biosci.* 9, 495-500.
- (102) Hollingsworth, J.W., und Atkins, E., Synovial inflammatory response to bacterial endotoxin, *Yale J.Biol.Med.* 38, 241- (1965).
- (103) Shio, H., und Ramwell, P.W., Prostaglandin E₁ and E₂ : Qualitative difference in platelet aggregation, in: *Prostaglandins in Cellular Biology, Band I*, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Pharriss, B.B., Plenum Press, New York und London, 1972, S.77-89.

- (104) Bennett, A., Eley, K.G., und Scholes, G.B., Effects of prostaglandins E₁ and E₂ on human, guinea-pig and rat isolated small intestine, Br.J. Pharmacol. 34, 630-638 (1968).
- (105) Kocsis, J.J., Hernandovich, J., Silver, M.J., Smith, J.B., und Ingemann, C., Duration of inhibition of platelet prostaglandin formation and aggregation by ingested aspirin or indomethacin, Prostaglandins 3, 141-144 (1973).
- (106) Henessian, S., Regan, W., Watson, D., und Haskell, T.H., Isolation and characterization of antigenic components of a new heptavalent Pseudomonas vaccine, Nature New Biol. 229, 209-210 (1971).
- (107) Hancock, I.C., Humphreys, G.O., und Meadow, P.M., Characterization of the hydroxy acids of Ps. aeruginosa 8602, Biochim.biophys.Acta 202, 389-391 (1970).
- (108) Fensom, A.H., und Gray, G.W., The chemical composition of the lipopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa, Biochem.J. 114, 185-196 (1969).
- (109) Nigam, V.N., Malchow, D., Rietschel, E.T., Lüderitz, O., und Westphal, O., Die enzymatische Abspaltung langkettiger Fettsäuren aus bakteriellen Lipopolysacchariden mittels Extrakten aus der Amöbe von Dictyostelium discoideum, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 351, 1123-1132 (1970).
- (110) Thiele, O.W., LaCave, C., und Asselineau, J., On the fatty acids of Brucella abortus and Brucella melitensis, Europ.J.Biochem. 7, 393-397 (1969).
- (111) Homma, J.Y., und Abe, C., Differences in chemical nature of the endotoxins derived from dissociants, types 1a and sm, of Pseudomonas aeruginosa, strain N 10, Japan.J. exp. Med. 42, 23-24 (1972).
- (112) Flower, R.J., Gryglewski, R., Herbaczynska-Cedro, K., und Vane, J.R., Effects of antiinflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis, Nature New Biol. 238, 104-106 (1972).
- (113) Finney, R.S.H., und Somers, G.F., The antiinflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives, J.Pharm.Pharmacol. 10, 613-620 (1958).
- (114) Finney, R.S.H., und Tarnoky, A.L., The pharmacological properties of glycyrrhetic acid hydrogen succinate (disodium salt), J.Pharm.Pharmacol. 12, 49-58 (1960).
- (115) Doll, R., Hill, J.D., Hutton, C., und Underwood, D.J., A clinical trial of a triterpenoid liquorice compound on gastric and duodenal ulcer, Lancet ii, 793-796 (1962).
- (116) Circus, W., Progress report on carbenoxolon sodium, Gut 13, 816-824 (1972).
- (117) Bennett, A., Stamford, I.F., und Unger, W.G., PGE₂ and gastric acid secretion in man, Adv.Biosci. 2, 165-269 (1973).
- (118) Classen, M., Koch, H., Dehyle, P., Weidenhiller, S., und Demling, L., Wirkung von Prostaglandin E₁ auf die basale Magensekretion des Menschen, Klin.Wschr. 48, 876-878 (1970).

- (119) Bennett, A., Stamford, I.F., und Unger, W.G., Prostaglandin E₂ and gastric acid secretion in man, *J.Physiol.* (London) 226, 96P-98P (1972).
- (120) Propping, P., Störungen des Elektrolythaushaltes und der Nierenfunktion durch Folsäure und andere Pteridine, Inauguraldissertation an der Med.Fak. der Freien Universität Berlin, 1970.
- (121) Haddow, A., in: Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Pteridines, Hrsg.: Wolstenholme, G.E.W., und Cameron, M.P., Churchill, London, 1954, S.100.
- (122) Boss, J.M.N., The provocation of mitosis by 6-styryl-2,4,5-triaminopyrimidine, *Brit.J. Cancer* 22, 614-622 (1968).
- (123) Brade, W., Herken, H., und Merker, H.J., Regeneration of renal tubular cells after lesion by temporary ischemia, folic acid, and 2,4,5-triamino-6-styrylpyrimidine, *Naunyn.Schm.Arch.Pharmakol.* 266, 95-100 (1970).
- (124) Taylor, D.M., Threllfell, G., und Buck, A.T., Chemically induced renal hypertrophy in the rat, *Biochem.Pharmacol.* 17, 1567-1574 (1968).
- (125) Williamson, M.B., und Guschelbauer, W., Metabolism of nucleic acids during regeneration of wound tissue, *J.biol.Chem.* 236, 1463-1466 (1961).
- (126) Robbins, S.L., Pathology, 3. Aufl., W.B. Saunders, Co., Philadelphia and London, 1968, S.92-99.
- (127) Sheppard, J.R., Difference in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in normal and transformed cells, *Nature New Biol.* 236, 14-16 (1972).
- (128) Burger, M.M., Bombik, B.M., Breckenridge, B.M., und Sheppard, J.R., Growth control and cyclic alterations of cyclic AMP in the cell cycle, *Nature New Biol.* 239, 161-163 (1972).
- (129) Takeguchi, C., und Sih, C.J., A rapid spectrophotometric assay for prostaglandin synthetase: Application to the study of non-steroidal antiinflammatory agents, *Prostaglandins* 2, 169-184 (1972).
- (130) Rudas, B., Zum Wirkungsmechanismus der Hemmung der reparativen Granulationsgewebe durch Antiphlogistika und Luftabschluß, *Arzneim.-Forsch.* 12, 386-388 (1962).
- (131) McGiff, J.C., und Itskovitz, H.D., Prostaglandins and the kidney, *Circ.Res.* 33, 479-488 (1973).
- (132) Jouvenaz, G.H., Nugteren, D.H., und van Dorp, D.A., Gas-chromatographic determination of nanogram amounts of prostaglandins E and F, *Prostaglandins* 2, 175-187 (1973).
- (133) Änggård, E., und Jonsson, C.E., Formation of prostaglandins in the skin following a burn injury, in: *Prostaglandins in Cellular Biology*, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Pharriss, B.B., Band I, Plenum Press, New York und London, 1972, S.269-284.

- (134) Bojeson, E., und Buchhave, K., The effects of fasting, bleeding, and sodium depletion on PGE₂ levels of rat sera (Abstr.), IUB 9th Int.Congr.Biochem. Stockholm, 1-7 July 1973, S.398.
- (135) Crunkhorn, P., und Willis, A.L., Cutaneous reactions to intradermal prostaglandins, Br.J. Pharmacol. 41, 49-56 (1971).
- (136) Willis, A.L., Identification of prostaglandin E₂ in rat inflammatory exudate, Pharmacol.Res.Comm. 2, 297-304 (1970).
- (137) McGiff, J.C., Terragno, N.A., Strand, J.C., Lee, J.B., Lonigro, A.J., und Ng, K.K.F., Selective passage of prostaglandins across the lung, Nature 223, 742-745 (1969).
- (138) Roseman, T.J., Sims, B., und Stehle, R.G., Stability of prostaglandins, Adv.Biosci. 9, 851-852 (1973).
- (139) Jaffe, B.M., Diskussionsbemerkung, in: Prostaglandins in Cellular Biology, Band I, Hrsg.: Ramwell, P.W., und Pharriss, B.B., Plenum Press, New York und London, 1972, S.223.
- (140) Lennarz, W.J., Bacterial lipids, in: Lipid Metabolism, Hrsg.: Wakil, S., Academic Press, London/New York, 1970, S.155-184.
- (141) Laurence, D.R., Clinical Pharmacology, 4. Aufl., Churchill Livingstone, Edinburgh, London und New York, 1973, S.21.5.
- (142) Amer, M.S., Cyclic GMP and gastric acid secretion, Am.J. Digest.Dis. 19, 71-74 (1974).
- (143) Wintrobe, M.M., Thorn, G.W., Adams, R.D., Bennett, I.L., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., und Petersdorf, R.G., Harrison's Principles of Internal Medicine, 6. Aufl., McGraw-Hill Book Co., New York, 1970, S.1435.
- (144) Flower, R.J., Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis, Pharmacol.Rev. 26, 33-67 (1974).
- (145) Janszen, F.H.A., und Nugteren, D.H., A histochemical study of the prostaglandin biosynthesis in the urinary system of rabbit, guinea pig, goldhamster, and rat, Adv. Biosci. 9, 287-292 (1973).
- (146) Blackwell, G.J., Flower, R.J., Parsons, M.F., und Vane, J.R., Factors influencing the turnover of prostaglandin synthetase, Br.J. Pharmacol. 53, 467P-468P (1975).
- (147) Taylor, D.M., Threllfell, G., und Buck, A.T., Stimulation of renal growth in the rat by folic acid, Nature 212, 472 (1966).
- (148) Brade, W., Herken, H., und Merker, H.J., Funktionsstörung und Stimulation des Wachstums der Niere durch Folsäure in hoher Dosierung, Klin.Wschr. 46, 1232-1233 (1968).
- (149) Documenta Geigy Scientific Tables, 6. Aufl., Hrsg.: Diem, K., Geigy, Ardsley, New York, 1962, S.165.
- (150) Baran, T.S., Langford, D.D., Liang, C.D., und Pitzele, B.S., Synthesis and biological activities of substituted glycyrrhetic acids, J.med.Chem. 17, 184-191 (1974).

meinen verehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. med. H. Merken und Herrn Prof. Dr. med. F. v. Bruchhausen, die mich während des Verlaufs der Arbeit durch reges Interesse und wertvolle Diskussion unterstützt haben, möchte ich herzlich danken. Ebenso bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Für die wertvolle Hilfe bei der Ausführung experimenteller Arbeiten bin ich Frau Carola Müller dankbar, und Herrn Helmut Dietz gilt mein Dank für die Anfertigung des Gleichgewichtsdialyseapparates.

Lebenslauf

Am
19.12.1946 in Portland, Maine, U.S.A. geboren.
1952- 1961 Besuch der Grundschule.
1961- 1965 Besuch der High School in den U.S.A.
1965- 1969 Studium am Bowdoin College, Brunswick, Maine, U.S.A.
1967- 1968 Studium an der Universität München im Rahmen eines Austauschprogramms.
1969 Abschluß des Studiums mit dem "Bachelor of Arts".
1969- 1971 Medizinstudium an der University of Vermont. Vorklinischer Abschluß mit dem National Board Examination, Teil I.
WS 1971 Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Klinische Medizin.
Sept. 1972- Ende 1974 Forschungstätigkeit am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.
WS 74- 75 Ablegung des medizinischen Staatsexamens.
Mai 1975- Mai 1976 Medizinalassistentenausbildung an der Freien Universität Berlin.
Aug. 1969 Eheschließung mit der jetzigen Lebensmittelchemikerin Dr. Gisela Ingerowski.

